

# ONDERZOEKINGEN OMTRENT HET IJZERTRANSFERRINE SYSTEEM

## PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN  
DOCTOR IN DE GENEESKUNDE  
AAN DE MEDISCHE FACULTEIT TE ROTTERDAM  
OP GEZAG VAN DE DECAAN  
PROF. D.C. DEN HAAN  
HOGLERAAR IN DE FACULTEIT DER GENEESKUNDE  
TEGEN DE BEDENKINGEN  
VAN DE FACULTEIT DER GENEESKUNDE  
TE VERDEDIGEN  
OP WOENSDAG 2 DECEMBER 1970 TE 16.00 UUR PRECIES

DOOR

BOY ELIAZAR ARON GLASER

GEBOREN TE BANDUNG IN 1942

1970  
DRUKKERIJ BRONDER-OFFSET N.V.  
ROTTERDAM

PROMOTOR: PROF. DR. B. LEIJNSE

COREFERENTEN: PROF. W. BERENDS

DR. H. G. VAN ELJK

*Aan Ineke*

*τις δε βίως τι δε τερπνον ἄτερ χρυσης Αφροδιτης;*



## INHOUD

	blz.
DOEL VAN HET ONDERZOEK	11
 HOOFDSTUK I	
LITERATUUR OVERZICHT	12
Inleiding	12
Enkele algemene eigenschappen van humaan transferrine	14
De binding van ijzer aan transferrine	17
De fysiologische rol van het transferrine	21
Onderzoekingen over de reactie van ijzer met transferrine	23
Studies over $K_1$ and $K_2$	25
De reactie tussen ijzer en transferrine	30
 HOOFDSTUK II	
MATERIALEN EN METHODEN	33
Transferrine, uitgangsstof en zuivering	33
Bepalingsmethoden van transferrine	34
Verzadigingsmethode van transferrine met ijzer	35
Ijzer, gebruikte zouten en bepalingstechniek	35
Radioactief ijzer	36
Gebruikte buffer	37
Gebruikte reductantia en bicarbonaat	37
Bijzonderheden betreffende de werkwijze die bij de dialyse gevolgd werd	37
Optische meetmethode	39
Electronspinresonantie-metingen	40

		blz.
	Methoden waarop de diverse berekeningen werden uitgevoerd	40
	Opgaven van de standaardafwijkingen bij de diverse methoden	42
HOOFDSTUK III	BEPALING VAN DE EVENWICHTSCONSTANTEN DOOR MIDDEL VAN DIALYSE-EXPERIMENTEN	43
	Inleiding	43
	Het ontwikkelen van de proefopzet	47
	Dialyse-experimenten waarbij ascorbinezuur werd toegevoegd	53
	Berekening van de evenwichtsconstanten van het transferrine-ijzer systeem m.b.v. de beschreven proefopstelling	61
	Enkele aanvullende proeven betreffende de invloed van de temperatuur en het bicarbonaat gehalte	63
	Dialyse-experimenten waarbij waterstofgas werd doorgeleid	67
	Conclusie	72
HOOFDSTUK IV	OPTISCHE METINGEN AAN HET TRANSFERRINE-IJZER COMPLEX	73
	Inleiding	73
	Het ontwikkelen van de proefopzet	77
	Optische metingen aan het transferrine-ijzer complex	79
	Conclusie	84
HOOFDSTUK V	ELECTRONSPINRESONANTIE-METINGEN AAN HET TRANSFERRINE-IJZER COMPLEX	85
	Inleiding	85
	Ontwikkeling van de proefopzet	87
	Uitgevoerde experimenten en verkregen resultaten	89
	Conclusie	98
HOOFDSTUK VI	DE BEPALING VAN DE REACTIE CONSTANTEN VAN HET TRANSFERRINE-IJZER SYSTEEM	100
	Inleiding	100
	Ontwikkeling van de proefopzet	104

Oriënterende metingen betreffende de reactiesnelheid van het transferrine-ijzer systeem	106
Metingen met de "stopped-flow"-techniek	111
Uitkomsten van de simulatie-experimenten	114
Conclusie	122
HOOFDSTUK VII DISCUSSIE	123
SAMENVATTING	135
SUMMARY	138
LITERATUUROPGAVE	141
AANHANGSEL	145
NASCHRIFT	149





## DOEL VAN HET ONDERZOEK

In het kader van het uitgebreide onderzoek aangaande de ijzerstofwisseling, dat in de afdeling Chemische Pathologie van de Medische Faculteit te Rotterdam plaatsvindt, is het gewenst gegevens te verkrijgen omtrent de evenwichtsconstanten en de reactieconstanten van het ijzer-transferrine systeem. Dit met het oog op berekeningen met computer modelsystemen van de ijzerstofwisseling. De uiteindelijke bedoeling hiervan is een modelsysteem te ontwikkelen dat van betekenis zou kunnen zijn voor het klinisch onderzoek van de ijzerstofwisseling. Een voorbeeld van een onderzoek, dat belangrijke gegevens bevat, die dergelijke berekeningen mogelijk maken, is het werk van Wiltink en medewerkers.\*

De eerste gedachte was, op grond van de zeer uitgebreide literatuur die over ijzer-transferrine bestaat, dat de genoemde constanten bekend zouden zijn of door berekening te verkrijgen zouden zijn. Een diepgaande literatuurstudie omtrent dit punt wees uit, dat dit geenszins het geval was. Integendeel, vele onopgeloste vragen aangaande de oplading van transferrine met ijzer en het ijzertransport door dit eiwit in het algemeen kwamen naar voren. In het bijzonder trok het onze aandacht dat de vraag of de oplading met Fe (II) of Fe (III) onder fysiologische omstandigheden, pH 7,4, geschiedt, niet is beantwoord.

De bedoeling van de hierna beschreven studie is de evenwichtsconstanten en de reactieconstanten van het transferrine-ijzer systeem te bepalen onder omstandigheden, die zo eenvoudig mogelijk zijn en tegelijk zo goed mogelijk bij fysiologische omstandigheden aansluiten.

Dit als eerste stap op de weg die moet leiden tot het vaststellen van genoemde grootheden in vivo.

\* In hoofdstuk I zal dit onderzoek worden vermeld.

## HOOFDSTUK I

### LITERATUUROVERZICHT

#### INLEIDING

Reeds in de oudheid was de heilzame werking van de toediening van ijzer bij bloedarmoede bekend. Het duurde echter tot 1713 voordat de eerste stap werd gezet op de weg die tot de opheldering van de ijzerstofwisseling in levende organismen zal kunnen leiden. In genoemd jaar toonden Lemmery en Geoffroy<sup>1)</sup> de aanwezigheid van ijzer aan in dierlijke weefsels. In 1843 verscheen het boek "Tierchemie" van J. Liebig. Een hoofdstuk in dit boek was gewijd aan de theorie van de ademhaling. Liebig betoogde dat de oxidatie van biologische substraten in het bloed plaatsvindt. Het ijzer dat in het hemoglobine aanwezig is zou daarbij een belangrijke rol spelen. Hemoglobine werd in 1867 in gekristalliseerde vorm verkregen door Hoppe-Seyler. De stelling van Mc Munn<sup>2)</sup> uit 1866 dat niet alleen de erythrocyten maar alle cellen de haem-groep bevatten is door de school van Hoppe-Seyler scherp bestreden en geraakte voorlopig in het vergeetboek. Door de welbekende onderzoeken over de celademhaling, begonnen door Warburg omstreeks 1910, is duidelijk geworden, dat het ijzer in de cellen bij de oxidatieve processen een grote rol speelt. Het onderzoek van Keilin, begonnen in 1925 en leidende tot de ontdekking van de cytochromen, stelde Mc Munn in het gelijk. De gedachte, dat de oxidatieve processen in het organisme in het bloed plaatsvinden, werd langzamerhand geheel verlaten. Het hemoglobine in de erythrocyten, dat 75% van het ijzer in het organisme bevat, bleek een transportfunctie voor zuurstof te bezitten. Pas in 1925 toonden Fontès

en Thivolle<sup>3)</sup> aan dat in het plasma aanwezige ijzer niet identiek is met hemoglobineijzer. Zij spraken van "fer circulant". Barkan vulde deze opvatting aan door in 1927<sup>4)</sup> te stellen dat dit ijzer aan een hoog moleculaire stof gehecht zou zijn. In zuur milieu bleek het ijzer makkelijk afsplitsbaar. Bij neutrale pH kon deze onderzoeker het ijzer niet door dialyse uit het plasma verwijderen. Barkan en Schales toonden in 1937<sup>5)</sup> aan dat het ijzer aan de globuline-eiwitfractie was gebonden; deze zelfde conclusie trok Valquist in 1941<sup>6)</sup> ook uit zijn elektroforese experimenten. In de dertiger jaren maakten Heilmeyer en medewerkers<sup>7)</sup> een begin met een klinisch wetenschappelijk onderzoek over de ijzerstofwisseling. In het bijzonder deden zij experimenten over de therapeutische toepassing aangaande het toedienen van ijzer bij anaemie. Een groot beletsel bij dit onderzoek was uiteraard het feit dat goede en handzame chemische bepalingstechnieken in die tijd ontbraken. Over het ijzertransportsysteem bleef voorlopig weinig bekend.

In 1945 bestudeerden Holmberg en Laurell<sup>8)</sup> het ijzerbindend vermogen van serum dat samen zou kunnen hangen met het ijzertransport. Belangrijke gegevens omtrent een ijzerbindend eiwit werden in 1944 door Schade en Caroline<sup>9)</sup> verkregen bij de bestudering van de remmende invloed die het wit van een ei heeft op de groei van *Shigella dysenteriae*, een bacterie die voor de groei ijzer nodig heeft. Genoemde auteurs leverden in 1946 het bewijs dat in plasma ook een ijzerbindend eiwit aanwezig is met dezelfde bacteriostatische eigenschappen<sup>10)</sup>.

Schade en medewerkers<sup>11)</sup> gaven in 1948 de naam siderophile aan het ijzerbindende plasma-eiwit; Holmberg en Laurell<sup>12)</sup> introduceerden in 1947 de betiteling transferrine. In de literatuur is de door Holmberg en Laurell gebruikte naam, waarin de transportfunctie goed tot uitdrukking komt, het meest in gebruik. Het ijzerbindend eiwit uit eieren wordt met de term conalbumine<sup>13)</sup> aangegeven.

Sørensen en Sørensen bestudeerden in 1939 een ijzerbindend eiwit uit melk<sup>14)</sup>. Blanc en Isliker<sup>15)</sup> noemden deze stof lactoferrine, een term die gebruikelijker is geworden dan de verschillende andere namen. Lactoferrine is aangetoond als uitscheidingsproduct van epitheelcellen maar komt ook voor in o.a. leucocyten<sup>16)</sup>. Een belangrijke eigenschap van deze ijzerbindende eiwitten bleek het typische absorptiespectrum te zijn van het ijzereiwit complex. Het maximum ligt bij 470 nm hetgeen correspondeert met de rode kleur van het complex. Deze eigenschap bleek een basis te geven voor een heden ten dage nog goed bruikbare bepalingstechniek.

Door het eerder genoemde werk van Schade en medewerkers kon worden vastgesteld dat het ijzerbindende plasma-eiwit bij de fractionering van plasma-eiwitten volgens Cohn in de fractie IV-4 wordt geconcentreerd.

Surgenor, Koechlin en Strong<sup>17)</sup> ontwikkelden een voortreffelijke isolatiemethode, gebaseerd op de principes van de techniek van Cohn<sup>18)</sup>. Het ijzerbindende plasma-eiwit bleek een  $\beta_1$ -globuline te zijn. Het kon in kristallijne toestand verkregen worden. Surgenor c.s. gaven er de naam  $\beta_1$ -metaalbindend globuline aan omdat het eiwit ook koper en zink bleek te kunnen binden. Zoals eerder reeds vermeld, is de uitdrukking transferrine op het ogenblik vrij algemeen in gebruik.

In het navolgende zullen een aantal gegevens uit de literatuur betreffende transferrine besproken worden voorzover dit met het oog op het experimentele werk nodig is. Een aantal overzichtsartikelen betreffende transferrine zijn in de literatuurlijst opgenomen<sup>19)</sup>.

#### ENKELE ALGEMENE EIGENSCHAPPEN VAN HUMAAN TRANSFERRINE

Zoals in de inleiding van dit hoofdstuk is vermeld, wordt het ijzerbindend eiwit transferrine geconcentreerd in de zg. fractie IV-4 wanneer humaan plasma wordt gefractioneerd met behulp van de procedure ontwikkeld door Cohn en medewerkers<sup>18)</sup>. Deze fractie bestaat hoofdzakelijk uit  $\beta$ - en  $\gamma$ -globuline en bevat tevens nog wat albumine.

Surgenor en medewerkers<sup>17)</sup> stelden vast dat bij verdere fractionering het mogelijk is transferrine te concentreren in de zg. fractie IV-7. Deze fractie bestaat voor driekwart uit transferrine verder uit  $\beta_2$ -globuline en albumine. Cohn en Koechlin<sup>20)</sup> gaven aan hoe uitgaande van deze fractie een kristallijn transferrine kan worden bereid; dit is uitvoerig beschreven door Koechlin<sup>21)</sup>. In de loop der jaren zijn andere isolatie- en zuiveringsmethodes ontwikkeld, te weten preparatieve elektroforese op zetmeelblokken<sup>22)</sup>, chromatografie met ionenwisselaars<sup>23)</sup>, gel filtratie<sup>24)</sup> en rivanol behandeling tezamen met ammoniumsulfaat<sup>25)</sup>. Transferrine preparaten kunnen verontreinigd zijn met hemopexine en heembindend eiwit dat qua relatieve molmassa en elektroforetische loopsnelheid overeenkomst met transferrine vertoont<sup>20)</sup>. Een chromatografische scheiding is mogelijk<sup>27)</sup>.

Reeds Surgenor en medewerkers stelden vast dat transferrine een glycoproteïne is. Zoals werd opgemerkt, kan het eiwit op grond van het elektroforetische gedrag een  $\beta_1$ -globuline genoemd worden. De stof maakt

ongeveer 3% uit van het totaal aan plasma eiwitten. Met verschillende methoden is de relatieve molecuulmassa van transferrine onderzocht. Nadat aanvankelijk 90.000 als relatieve molecuulmassa werd aangenomen<sup>28)</sup>, worden thans lagere waarden als een juistere benadering beschouwd.

Mann en medewerkers<sup>29)</sup> bepaalden in 1970 de molecuulmassa van humaan serum transferrine op verschillende manieren; zij kwamen op de volgende waarden met behulp van de diverse methoden:

<u>Methode</u>	<u>Molecuulmassa</u>
sedimentatie evenwicht in 0,1 molair NaCl, pH 7,0	76.600
sedimentatie snelheid in 0,1 molair NaCl, pH 6,0	79.300
sedimentatie evenwicht in 6 molair guanidine-HCl	76.800
sedimentatie evenwicht van gereduceerd en carboxy-gemethyleerd eiwit in 6 molair $\beta$ -mercaptoethanol	78.300
gel filtratie van gereduceerd en carboxy-gemethyleerd eiwit in 6 molair guanidine-HCl	70.000 - 80.000
	zonder kleinere componenten

Bij het toepassen van de bovenvermelde zetmeelgel-electroforese stelde Smithies<sup>30)</sup> in 1955 vast dat humaan transferrine uit meer dan één molecuulsoort bestaat. Dit leidde tot een uitgebreid onderzoek naar het voorkomen van varianten van transferrine. Vastgesteld werd dat het hier ging om genetisch bepaalde varianten, die bij gezonde individuen voorkomen. De typering van de varianten geschiedt op basis van de elektroforetische mobiliteit. Het meest voorkomende transferrine wordt met een C aangeduid, de sneller lopende varianten met een B, de langzamer lopende met een D. Tot nu toe zijn een twintigtal transferrine varianten ontdekt. Onderzoekingen betreffende de verspreiding van diverse varianten over de verschillende bevolkingsgroepen in de wereld leverde interessante gegevens op, doch dit valt buiten het kader van dit betoog. De aminozuur-samenstelling van humaan transferrine C is weergegeven in tabel I-1 op grond van de literatuuropgaven (29) en (31).

Volgens diverse onderzoekers<sup>32)</sup> vertoont de samenstelling van de verschillende transferrine varianten weinig verschil. Een enkel anders luidende mededeling is wel bekend. Zo zou de D<sub>1</sub> variant als eindstandig aminozuur glycine bevatten, transferrine C daarentegen asparaginezuur<sup>33)</sup>. Ook betref-

Tabel I-1

Aminozuursamenstelling van humaan serum-transferrine op basis van molecuulmassa 76.600.

Aminozuur	(29)	(31)
Lys	51	58
His	19	16
Arg	24	24
Asp	81	74
Thr	30	26
Ser	40	35
Glu	58	55
Pro	30	28
Gly	54	46
Ala	59	32
$\frac{1}{2}$ Cys	32	32
Val	43	34
Met	4	8
Ile	14	14
Leu	57	56
Tyr	24	23
Phe	28	26
Try	9	7

fende het koolhydraat gedeelte van humaan transferrine zijn onderzoeken verricht. Jamieson<sup>34)</sup> geeft de volgende samenstelling van dit onderdeel. Per mol transferrine zijn aanwezig 4 molen siaalzuur, 8 molen N-acetylglucose-amine, 4 molen galactose en 8 molen mannose. De koolhydraatgroep zou via het asparaginezuur verbonden zijn met de eiwitcomponent van transferrine. Van betekenis hierbij zou het neuraminezuur zijn. Inwerking van neuramidase op normaal transferrine heeft tengevolge dat stapsgewijs vier componenten ontstaan die met zetmeelgel-electroforese kunnen worden onderscheiden<sup>34)</sup>. Gezien het feit dat genoemd enzym de binding van neuraminezuur met andere groepen verbreekt, wordt verondersteld dat normaal transferrine vier neuraminezuurresten bevat.

De vraag of transferrine uit een enkelvoudige keten is opgebouwd dan wel uit een aantal subunits is niet afdoende beantwoord. In het bijzonder is gedacht aan twee identieke subunits verbonden door een S-S brug. Dit in verband met het nog te bespreken feit dat één transferrine molecuul twee ijzeratomen kan binden. Jeppson<sup>35)</sup> meende in 1967 deze theorie te kunnen bevestigen, doordat in zijn experimenten, waarbij humaan transferrine werd gereduceerd en gealkyleerd, de sedimentatiecoëfficiënt sterk daalde. Kwam de oorspronkelijke waarde overeen met een relatieve molmassa van 80.000,

na de genoemde behandeling volgde uit de dan gemeten grootheid een relatieve molmassa van 40.000. Greene en Feeney<sup>36)</sup> verkregen in 1968 met vergelijkbare technieken geen aanwijzingen voor het bestaan van sub-units. Ook het feit dat slechts één N-eindstandig valine-rest werd aangetoond pleit voor een enkele keten. Ook het reeds geciteerde werk van Mann e. a.<sup>29)</sup> geeft een duidelijke aanwijzing voor het bestaan van één polypeptide keten. Waarnemingen in het eigen laboratorium wijzen op één polypeptide keten met S-S bruggen bij verbreking waarvan het ijzerbindend vermogen verloren gaat<sup>74)</sup>.

## DE BINDING VAN IJZER AAN TRANSFERRINE

Reeds Surgenor en medewerkers<sup>17)</sup> stelden in 1948 door analyse van gekristalliseerd humaan transferrine vast dat per molecuul twee atomen ijzer kunnen worden gebonden.

In de inleiding van dit hoofdstuk kwam ter sprake dat de binding van ijzer aan transferrine tot de vorming van een stof leidt, die een karakteristiek absorptiespectrum heeft, hetgeen Schade en Caroline in 1946 beschreven<sup>10)</sup>. Algemeen wordt aangenomen dat beide ijzeratomen een gelijke bijdrage leveren aan de absorptie bij 470 nm. De vraag of beide bindingsplaatsen voor ijzer in ieder opzicht gelijkwaardig zijn is nog niet afdoende beantwoord. In het navolgende zal hierop worden teruggekomen.

Door meerdere onderzoekers is getracht na te gaan op welke wijze de ijzeratomen in het transferrinemolecuul zijn gebonden. De meest voor de hand liggende vraag daarbij is of het ijzer als Fe (II) of als Fe (III) aanwezig is. Een eerste antwoord op deze vraag is te vinden in het meermalen aangehaalde artikel van Surgenor, waarin op grond van magnetische susceptibiliteitsmetingen van Michaelis, die via een persoonlijke mededeling bekend zijn, wordt gesteld dat het ijzer in driewaardige toestand voorkomt, terwijl er sprake is van een ionenbinding. Ook wordt aangegeven dat het onverschillig is of het ijzertransferrine ontstaat door opladen met Fe (II) of met Fe (III). De experimentele gegevens van Michaelis ontbreken helaas in het artikel van Surgenor en ook in Koechlin's artikel. Een zorgvuldig onderzoek over de paramagnetische susceptibiliteit van varkenstranferrine opgeladen met Fe (II) werd in 1955 door Ehrenberg en Laurell<sup>37)</sup> verricht. Hun conclusie was dat de gevonden waarde 6,08 ( $\pm$  0,10) Bohrmagnetons (B.M.) het best overeenkomt met Fe (III), gekoppeld door hoofdzakelijk ionogene bindingen

aan het eiwit en een zwakke interactie tussen beide Fe-atomen. Deze conclusie is gebaseerd op de volgende overwegingen:

- a) Fe (II) gekoppeld via ionogene bindingen, indien geen interactie tussen de twee ijzeratomen gebonden aan één transferrine molecuul bestaat, geeft een  $\mu_{\text{eff}}$  van 4,90 B.M.
- b) de gegevens van  $\mu_{\text{eff}}$  van ionogene Fe (II) verbindingen wijzen uit dat de waarden liggen tussen 5,1 en 5,6 B.M. Dit komt overeen met later verkregen gegevens vermeld door Griffith<sup>38)</sup>.
- c) twee Fe (III) atomen per transferrine molecuul zonder onderlinge interactie en ionogeen gebonden, zouden een  $\mu_{\text{eff}}$  van 5,92 B.M. geven.
- d) indien er een volledige magnetische interactie zou bestaan tussen de twee Fe (III) atomen, dan volgt  $\mu_{\text{eff}} = \sqrt{\frac{1}{2}n(n+2)} = \sqrt{60} = 7,75$  B.M. Immers de twee atomen kunnen als een geheel worden beschouwd en het aantal ongepaarde electronen is dan  $2 \times 5$ .

Het zal duidelijk zijn dat de conclusie die Ehrenberg en Laurell hebben getrokken een hypothetische kant bezit. Vermeldenswaard is met betrekking tot eerder genoemde vraag het werk van Malmström en medewerkers met de E.S.R. techniek<sup>39)</sup>. Ook deze gegevens wijzen erop dat het ijzer in het ijzertransferrinecomplex in driewaardige toestand is. Uit zorgvuldige onderzoeken betreffende de structuren van allerlei ijzerbindingen van Fe (II) en Fe (III) waaronder ook de biologisch zo belangrijke heemverbindingen, is gebleken, dat zowel in complexen van ionogene aard als van covalente aard het ijzer omringd is door zes groepen. Het ligt voor de hand te veronderstellen dat dit in het ijzertransferrine complex ook het geval zal zijn. Een aantal gegevens zijn over deze octaëdrische bouw verzameld. In de eerste plaats dienen de onderzoeken van Aisen en medewerkers<sup>40)</sup> te worden vermeld waarbij het aantal protonen wordt gemeten dat vrij komt wanneer een atoom Fe (III) aan transferrine gebonden wordt. Vastgesteld werd dat per ijzeratoom 3 protonen worden vrijgemaakt in 3-5 minuten. Het bestudeerde pH gebied liep van 7,5-8,9; in dit gehele gebied was het resultaat hetzelfde. Warner en Weber<sup>41)</sup> vonden hetzelfde bij conalbumine. De conclusie is dat geen groepen met pK waarden tussen 7 en 9 aan de reactie deelnemen. Verondersteld wordt dat er 3 fenolische groepen betrokken zijn bij genoemd proces. Schade en medewerkers<sup>10)</sup> stelden vast, dat bij de binding van Fe (II) aan transferrine 2 tot 3 protonen vrijkomen. Het is van betekenis dat Ross en medewerkers<sup>42)</sup> aantoonen dat Fe (II) toevoeging resulteerde in het vrijkomen van 3 protonen per atoom ijzer;



de reactie tussen transferrine en Fe (III) was in hun experimenten onvolledig, zodat geen conclusie mogelijk is.

De electron spin resonantie spectrometrie als hulpmiddel voor onderzoek van de ijzertransferrine complexen werd reeds genoemd. Aasa en medewerkers vonden het volgende E.S.R.-spectrum, weergegeven in figuur I-1 (43).

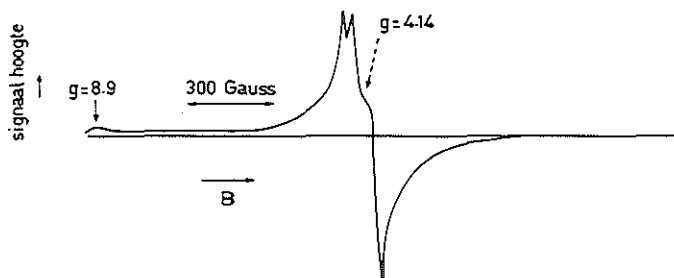


Fig. I-1. E.S.R.-spectrum van het transferrine-ijzer (III) complex, bij  $77^{\circ}$  K, volgens Aasa e.a.<sup>43)</sup>  
B geeft de richting van het magnetveld aan.

Zij waren tevens in staat de piek bij  $g = 4,14$  bij verschillende ijzertransferrine verhoudingen te meten. Het resultaat is weergegeven in figuur I-2.

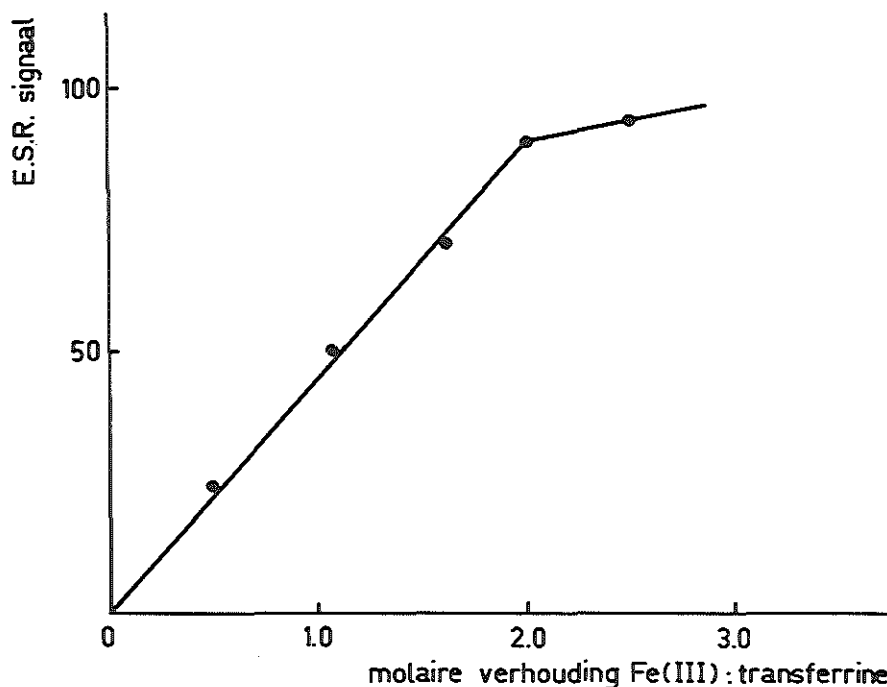


Fig. I-2. Amplitude van het E.S.R.-signaal in arbitraire eenheden bij  $g = 4,14$  en  $77^{\circ}$  K van ingevroren ijzer-transferrine oplossingen met wisselende molaire verhouding van beide componenten volgens Aasa<sup>43)</sup>.

Aasa en medewerkers veronderstelden op grond van de E.S.R.-opnamen dat behalve de drie genoemde fenolische groepen enkele stikstofhoudende groepen betrokken zouden zijn bij de binding van metalen. Vooral het E.S.R.-spectrum van koper-transferrine bood aanknopingspunten voor deze opvatting. De veronderstelling is, dat bij de vorming van de bindingen met Fe (III) 3 tyrosyl en 2 imidazol groepen van histidine van het transferrine een rol spelen.

Aasa en medewerkers komen tot de conclusie op grond van E.S.R.-metingen dat de twee ijzeratomen in een ijzertransferrine complex geen sterke interactie hebben en minstens 0,90 nm van elkaar verwijderd zijn.

Een ingewikkelde problematiek bestaat met betrekking tot de betekenis van bicarbonaat voor de binding van ijzer aan transferrine. Reeds Schade e. a.<sup>10)</sup> stelden in 1946 dat bicarbonaat absoluut onmisbaar zou zijn bij de vorming van het ijzertransferrine complex. Deze auteurs werkten met Fe (II). In aanwezigheid van zuurstof ontstaat, wanneer bicarbonaat wordt toegevoegd in de verhouding 1:1 met ijzer, een maximale kleurontwikkeling. De rode kleur ontstaat niet, doch een geel gekleurde verbinding wordt gevormd in afwezigheid van zuurstof. Toevoeging van ascorbinezuur doet ook in anaeroob milieu de rode kleur ontstaan. Opvallend is dat voor de grondstelling dat bicarbonaat onmisbaar is, geen experimentele bewijzen worden aangevoerd door deze auteurs. De gegevens betreffende de rol van zuurstof en vitamine C zijn door anderen niet ondersteund.

Warner en medewerkers<sup>41)</sup> meenden met behulp van C-14 te kunnen vaststellen dat per ijzeratoom ook één bicarbonaat ion aan transferrine wordt gekoppeld.

In 1960 poneerden Aisen en medewerkers<sup>40)</sup> dat bij de opstelling van de evenwichtsvergelijkingen voor de reactie tussen ijzer en transferrine bicarbonaat als mede reagerende stof diende te worden betrokken. In 1967 veranderden dezelfde onderzoekers op grond van E.S.R.-metingen hun opvattingen<sup>44)</sup> Voor de binding van Fe (III) aan transferrine zou bicarbonaat niet onmisbaar zijn. Het complex ijzertransferrine zou echter het karakteristieke absorptiespectrum met maximum bij 470 nm missen. Voor dit spectrum zou bicarbonaat nodig zijn, maar vervangbaar door oxalaat of nitrilotriacetaat. De opvatting, dat het absorptiemaximum bij 470 nm niet optreedt als  $\text{HCO}_3^-$  afwezig is, wordt ook gedeeld door Young en Perkins<sup>45)</sup>. Zij stellen wel dat het bicarbonaat vervangen kan worden door andere anionen, bijvoorbeeld fosfaat. De verschillende anionen zouden verschillende molaire extinctiecoëfficiënten geven, b.v. bij bicarbonaat en fosfaat. Aisen en medewerkers<sup>44)</sup>

merken verder op tot de conclusie te zijn gekomen dat het bicarbonaat geen rol speelt bij de binding van ijzer aan transferrine, waarbij zij een octaedrische omringing veronderstelden. Zij leiden dit af uit het feit dat de proton-relaxatiesnelheden van ijzer-transferrine en ijzer-bicarbonaat-transferrine weinig verschil vertonen.

Uit een en ander blijkt dat de rol van het bicarbonaat bij de ijzerbinding nog duister is. Vast staat inmiddels dat de reactie tussen transferrine en ijzer door bicarbonaat sterk versneld wordt. Maar dit kan op een katalyse berusten terwijl het anion geenszins betrokken raakt bij de uiteindelijke ijzer-transferrinebinding.

### DE FYSIOLOGISCHE ROL VAN HET TRANSFERRINE

In de inleiding van dit hoofdstuk werd reeds opgemerkt dat de term transferrine aangeeft dat dit eiwit ijzer zou transporteren. Op dit punt bestaat vrijwel een communis opinio, hoewel over het mechanisme van dit transport geenszins eenheid van opvatting heerst.

Het weergegeven schema van Pollycove geeft uitstekend de omvang van het ijzertransport via plasma in het menselijk organisme aan, figuur I-3<sup>46)</sup>.

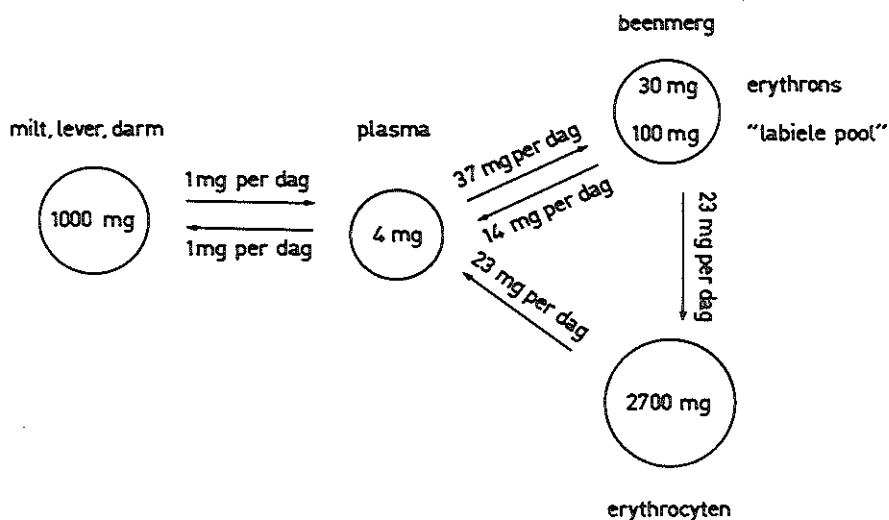


Fig. I-3. Verdeling en kinetiek van ijzer in vivo, volgens Pollycove<sup>46)</sup>.

Van veel betekenis is het feit dat bij het transportproces het eiwitdeel niet verbruikt wordt. De gegevens verzameld over de halfwaarde tijd van transferrine en de halfwaarde tijd van het ijzer in serum zijn in dit opzicht duidelijk. De eerste bedraagt 10 dagen, de tweede 90 minuten<sup>47)</sup>.

Het eiwitdeel wordt dus vele malen gebruikt voor het transport van ijzeratomen. Er is geen definitieve uitspraak mogelijk op het moment over de vraag of het transferrine het ijzer ter plaatse bij het heemsynthetiserend systeem aflevert of dat geioniseerd ijzer de vorm is waarin de weg van plasma naar de heemsynthetiserende cellen wordt afgelegd.

Jandl en Katz<sup>48)</sup> stellen zich op het eerste standpunt. Zij menen te kunnen aantonen dat het transferrine-ijzer complex als geheel aan de reticulocyten wordt gekoppeld, waarna ijzer wordt overgedragen van transferrine naar het heemsynthetiserende systeem. Dit bewijst natuurlijk nog niet dat transferrine ook in staat is hetzelfde te doen naar de cellen van het erythropoietische systeem in beenmerg, waar de grote massa van het heem wordt gevormd. Immers hiertoe zou het transferrine-ijzer complex de bloedvaten dienen te verlaten. Ook hiervoor dragen Jandl en Katz aanwijzingen aan. Met J-131 gemerkt transferrine werd in de bloedbaan gebracht en het verdwijnen van J-131 werd in de loop der tijd vervolgd.

Het bleek een bifasisch proces, een eerste snelle fase en een tweede veel langzamer fase. De interpretatie van genoemde onderzoekers is dat de snelle verdwijning de verspreiding van J-131 transferrine over de gehele extracellulaire ruimte bewijst, dus het uittreden uit de bloedbaan, de tweede fase is in overeenstemming met eerdergenoemde halfwaardetijd van het eiwit.

Laurell<sup>49)</sup> is de mening toegedaan dat het evenwicht tussen geioniseerd ijzer, transferrine en ijzer-transferrine een rol speelt in het ijzertransport. Hij stelt dat de geioniseerde vorm van ijzer de bloedbaan verlaat en binnenkomt. Zijn argumenten zijn indirect van aard. Zij berusten op de gegevens die bekend zijn over het gedrag van het ijzertransferrine systeem bij ijzerbelastingsproeven en bij ziekte toestanden. Inderdaad geven deze de indruk van een beweeglijk evenwicht en Laurell stelt dan ook dat de wet van de massawerking van toepassing kan worden genoemd. Het is geen sterke argumentatie.

Enkele punten die van belang zijn voor het onderhavige onderwerp dienen te worden vermeld. Opvallend is het feit dat het serumijzer als normale waarde 11-32  $\mu\text{mol/l}$  heeft, terwijl het totaal ijzerbindend vermogen (TYBC),

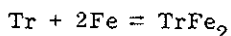
dat op transferrine berust als normale waarden heeft 50-72  $\mu\text{mol/l}$ . Er is dus slechts 1/3 van de bindingscapaciteit in gebruik en een latente ijzerbindingscapaciteit (LYBC) van 2/3 blijft over.

Wiltink en de zijnen<sup>50)</sup> vonden dat de LYBC een grootheid is die zeer opvallende correlaties vertoont met allerlei voor de ijzerstofwisseling belangrijke factoren.

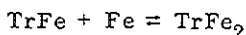
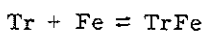
Een overzicht te geven van de interessante gegevens betreffende de verandering in het serumijzergehalte, de TYBC en de LYBC bij diverse ziektebeelden zou te ver voeren. Een bewijs voor het feit dat transferrine een functie bij het ijzertransport vervult, kan worden gezien in het feit dat bij patiënten die geen transferrine bezitten een anaemie bestaat die hypochroom en microcytair van aard is<sup>7c)</sup>. In tegenstelling tot wat bij de ijzergebreksanaemie wordt gevonden, waren de weefsels bij atranferrine-anaemie rijk aan ijzer<sup>7c)</sup>.

#### ONDERZOEKINGEN OVER DE REACTIE VAN IJZER MET TRANSFERRINE

Per transferrinemolecuul kunnen twee ijzeratomen gebonden worden, dit feit is reeds door Laurell en medewerkers<sup>49)</sup> vastgesteld en door anderen<sup>17)</sup> eveneens aangetoond. De vraag is nu, vindt de volgende reactie plaats



of is er sprake van 2 reacties



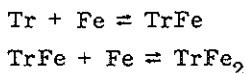
Aisen en medewerkers<sup>44)</sup> voerden elektroforese-studies uit met betrekking tot dit probleem. Zij vonden bij hun vrije elektroforese met transferrine dat tot verschillende graden van verzadiging met ijzer was opgeladen, aanwijzingen voor 3 componenten. Conalbumine vertoonde hetzelfde verschijnsel maar de scheiding was scherper. Yoshioka en medewerkers<sup>51)</sup> vonden met elektroforesetechnieken op zetmeelgelblokken slechts twee pieken. Opgemerkt moet worden, dat het scheidend vermogen van hun elektroforese lager ligt dan bij de proef van Aisen.

Een steun voor de theorie dat de producten TrFe en TrFe<sub>2</sub> beide be-

staan, is te putten uit de proeven van Wenn en Williams<sup>52)</sup> waarbij gebruik werd gemaakt van iso-electrofocussing techniek van ovotransferrine<sup>75)</sup>. Van Eijk en medewerkers<sup>53)</sup> bewezen een en ander ook voor konijnentransferrine. Woodworth en medewerkers<sup>54)</sup> huldigen een andere mening, dit naar aanleiding van iso-electrische fractioneringsproeven met conalbumine en transferrine. Hun conclusie is, dat weliswaar drie componenten aanwezig zijn en wel met een eiwit-ijzer verhouding 1:0, 1:1 en 1:2, maar dat een andere interpretatie van dit resultaat noodzakelijk is dan de in het voorgaande besprokene. Hun stelling is, dat de ijzerbindende eiwitten met ijzer een stof vormen, die bestaat uit 2 ijzeratomen geladen aan één transferrine respectievelijk conalbumine molecuul. Maar verder kan nog aan zo'n complex een transferrine resp. een conalbumine worden gebonden zodat een dimeer ontstaat,  $\text{Fe}_2\text{Tr-Tr}$  of  $\text{Fe}_2\text{CA-CA}$ . Het waarnemen van de stof met de verhouding 2 ijzeratomen op 1 ijzerbindend molecuul zou een gevolg zijn van ontleding tijdens de elektroforese, de dimeer zou dan dissociëren. Tot nu toe is nog niet bewezen dat de moleculaire grootte van het ijzereiwit complex het dubbele zou zijn van de moleculaire grootte van transferrine of conalbumine. Dit is een zwakke plek in de bewijsvoering van Woodworth en medewerkers. Ook de andere argumenten zijn niet zo overtuigend. Woodworth's opvatting dat er slechts één ijzertransferrine complex bestaat met betekenis voor het ijzertransport en dat het tweede aantoonbare complex een artefact is, dient in het licht van zijn studies over de ijzertransferrine binding te worden gezien. Woodworth<sup>55)</sup> heeft zich consequent achter de opvatting geplaatst, die reeds door Warner in 1953<sup>41)</sup> werd geponeerd, dat de twee ijzeratomen aan transferrine werden gebonden volgens de zogenaamde alles of niets reactie, dus  $\text{Tr} + 2\text{Fe} = \text{TrFe}_2$ . Zijn hypothese is, dat doordat een ijzeratoom aan transferrine wordt gekoppeld, de tweede plaats voor een ijzeratoom toegankelijk wordt en snel bezet wordt. Deze toegankelijkheid die ontstaat, sluit tevens in, dat een zodanige verandering in het eiwitmolecuul is opgetreden, dat het gebonden eerste ijzeratoom slechts vrij kan en moet komen als het tweede het transferrine verlaat.

Met betrekking tot de snelheidsconstanten veronderstelt Woodworth dat de binding van het eerste ijzeratoom veel langzamer gaat dan de conformatie van het eiwit en de daarop volgende koppeling van het tweede ijzeratoom. De eerste stap is dus snelheidsbepalend. Hetzelfde geldt uiteraard op overeenkomstige wijze voor het vrijkomen van ijzer uit het ijzertransferrine complex. Ons inziens verdient de hypothese dat er sprake is van

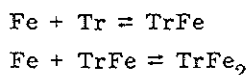
twee stappen



de voorkeur.

## STUDIES OVER $K_1$ EN $K_2$

Uitgaande van de veronderstelling dat de binding van ijzer aan transferrine verloopt volgens:



trachtten in 1962 Davis, Saltman en Benson<sup>56)</sup> de evenwichtsconstanten van beide evenwichtsreacties te bepalen. Zij gingen daarbij uit van de opvatting dat het Fe reageert in de vorm van Fe (III) en namen in aanmerking dat Fe (III) in het organisme in de chelaatvorm als laag molecuulair complex aanwezig moet zijn. Dit laatste op grond van bijvoorbeeld proeven van Charley. Op grond van voorlopige resultaten met behulp van een dialysetechniek verkregen door Rubin, namen zij aan dat de waarden voor de  $K$ 's groter dan  $10^{27}$  zouden zijn. Een en ander zetten zij om in een proefopzet die als volgt te beschrijven is.

In een Visking dialyseslang werden 2 ml van een transferrineoplossing in 0,04 molair  $\text{NaHCO}_3$  pH 7,4 gebracht. het transferrine was verzadigd met ijzer, dit ijzer gemerkt met Fe-59. Davis en medewerkers stellen dat de "concentratie" van het eiwit 5,5  $\mu\text{mol/l}$  was. Zij geven aan, dat het transferrine is gezuiverd volgens Soben en dat het is opgeladen met ijzercitraat 34  $\mu\text{g Fe/ml}$ , specifieke activiteit 5200 cpm/ $\mu\text{g Fe}$ . De overmaat ijzercitraat is via een ionenwisselaar verwijderd. De Visking-slang met genoemde inhoud van 2 ml werd in een buitenvloeistof geplaatst van 100 ml die 0,04 molair  $\text{NaHCO}_3$  pH 7,4 bevatte. De gasfase werd constant ververst en bevatte 5%  $\text{CO}_2$  - 95%  $\text{O}_2$ . Aan de buitenvloeistof werd in sommige experimenten EDTA\* toegevoegd en wel zodanig dat een proef werd gedaan zonder

\* EDTA = ethyleendiamine-tetra-acetaat.

EDTA, met 0,001 M EDTA, met 0,01 M EDTA en met 0,1 M EDTA. In de buitenvloeistof werd de radioactiviteit gemeten en vastgesteld dat na 30 uur een plateau werd bereikt. De dialyse werd dan nog 15 uur voortgezet. Vervolgens werd het eiwitgehalte van de oplossing in de Visking-slang met de biureetreactie bepaald en de radioactiviteit gemeten.

De auteurs gaan van de volgende veronderstellingen uit:

$$1. \quad \text{TrFe}_2 \rightleftharpoons \text{TrFe} + \text{Fe}^{3+} \quad K_1 = \frac{[\text{TrFe}] \times [\text{Fe}^{3+}]}{[\text{TrFe}_2]}$$

$$2. \quad \text{TrFe} \rightleftharpoons \text{Tr} + \text{Fe}^{3+} \quad K_2 = \frac{[\text{Tr}] \times [\text{Fe}^{3+}]}{[\text{TrFe}]}$$

$$3. \quad \text{LFe} \rightleftharpoons \text{L} + \text{Fe}^{3+} \quad K_L = \frac{[\text{L}] \times [\text{Fe}^{3+}]}{[\text{LFe}]}$$

L is op te vatten als een laag moleculaire ligande, in dit geval EDTA.

4. Transferrine verlaat de dialyse-slang niet, dus

$$[\text{Tr}]_{\text{totaal}} = [\text{Tr}] + [\text{TrFe}] + [\text{TrFe}_2]$$

5. Het totaal ijzergehalte in de dialyse-slang is

$$[\text{Fe}]_{\text{binnen}} = [\text{Fe}^{3+}] + [\text{LFe}] + [\text{TrFe}] + [\text{TrFe}_2]$$

6. Het ijzer in de buitenvloeistof is totaal

$$[\text{Fe}]_{\text{buiten}} = [\text{Fe}^{3+}] + [\text{LFe}]$$

7. Wanneer  $K_1 \gg K_2$  dan geldt, wanneer de verzadiging lager dan 50% is:

$$[\text{TrFe}_2] = 0 \text{ en dan is } [\text{Tr}]_{\text{totaal}} = [\text{Tr}] + [\text{TrFe}].$$

Gemeten werd zoals gesteld de radioactiviteit na 45 uur in de binnen- en buitenvloeistof en de eiwitconcentratie in de binnenvloeistof. Hieruit volgen op grond van berekeningen de andere gegevens die ook in de bijgaande tabel I-2 zijn te vinden. Uit de toelichting volgt ook nog dat  $\text{p}K_2$  uit de experimen-



Tabel I-2

Evenwichtsodialyse van Fe-59 transferrine tegen toenemende concentraties van EDTA.

EDTA ( $\mu\text{mol/l}$ )	0	$10^{-3}$	$10^{-2}$	$10^{-1}$
c.p.m./ml in dialyse-zakje	3400	1750	1280	465
[Fe] in binnenvloeistof ( $\mu\text{mol/l}$ )	10.6	5.7	4.0	1.4
c.p.m./ml in buitenvloeistof	0	38	41	59
[Fe] in buitenvloeistof ( $\mu\text{mol/l}$ )	0	0.12	0.13	0.19
[Tr] totaal ( $\mu\text{mol/l}$ )	5.5	5.5	5.5	5.5
$\text{pK}_1$	--	27.7	--	--
$\text{pK}_2$	--	--	30.3	30.2

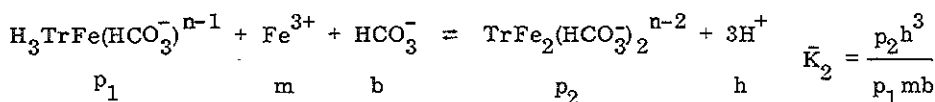
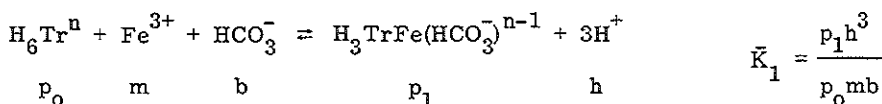
tele gegevens is berekend, gebruik makende van vergelijking 7. en  $\text{pK EDTA} = 25,1$ ;  $\text{pK}_1$  is afgeleid met behulp van de waarde die voor  $\text{pK}_2$  was gevonden. Verdere gegevens over de berekening ontbreken. Hoewel dit niet vermeld wordt, zal ongetwijfeld een grondslag van de berekening gevormd worden door de veronderstelling dat na 45 uur de  $[\text{Fe}^{3+}]$  in de binnen- en buitenvloeistof gelijk is, evenals dit moet gelden voor  $[\text{LFe}]$ .

Hierbij kan worden aangemerkt dat  $\text{pK EDTA}$  afhankelijk is van de pH, de hier gebruikte waarde 25,1 is van Schwartzenbach en Heller<sup>57)</sup> en bepaald in zuur milieu. Het is nauwelijks aan twijfel onderhevig dat de waarde voor  $\text{pK EDTA}$  bij pH 7,4 aanzienlijk van 25,1 zal afwijken. Ook is niet na te gaan of er werkelijk  $\text{Fe}^{3+}$  aanwezig is, in ieder geval zal  $[\text{Fe}^{3+}]$  kleiner moeten zijn dan met het oplosbaarheidsproduct van  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  overeenkomt.

Een tweede poging om de evenwichtsconstanten via een dialysetechniek te bepalen, is gedaan door Aasa, Malmström, Saltman en Vänngård in 1963<sup>43)</sup>. Zij werkten met een dialysetechniek, waarbij met ijzer, gemerkt met Fe-59, verzadigd transferrine in de dialyse-slang aanwezig was en waarbij in de buitenvloeistof EDTA of citraat werd gevoegd. In het geval dat met EDTA werd gewerkt, werd de pH tussen 8 en 9 gebracht, bij citraat op een waarde tussen 6 en 7. Dit op grond van theoretische overwegingen, teneinde alle verzadigingswaarden tussen 0 en 100% te kunnen verkrijgen. Een buffer werd niet gebruikt, de pH werd met NaOH ingesteld. Bij de lage pH werd geen  $\text{HCO}_3^-$  toegevoegd, maar geëquilibreerd met de lucht. Bij de hoge pH werd de berekende hoeveelheid  $\text{HCO}_3^-$  toegevoegd na het instellen van de pH. Daar de evenwichtsconstanten van citraat bekend zijn bij  $25^\circ \text{C}$  en van EDTA bij aanwezigheid van 0,1 molair KCl bij  $20^\circ \text{C}$ ,

werden deze omstandigheden gebruikt.

De vergelijkingen waar de onderzoekers vanuit gaan, zijn:



Het aantal metaalionen per molecuul eiwit, een experimenteel gegeven, is weer te geven door

$$r = \frac{p_1 + 2p_2}{p_0 + p_1 + p_2}$$

Bij een bepaalde pH en  $[HCO_3^-]$  zijn de schijnbare constanten  $K_1'$  en  $K_2'$  te gebruiken,  $h$  en  $b$  vervallen dan. Deze schijnbare constanten staan in relatie tot  $r$ :

$$r = \frac{K_1' m + 2K_1' K_2' m^2}{1 + K_1' m + K_1' K_2' m^2}$$

De relatie tussen  $\bar{K}_1$  en  $\bar{K}_2$  kan weergegeven worden als  $\bar{K}_2 = 1/4 \times R \times \bar{K}_1$ , waarbij  $R$  samenhangt met de interactie van beide plaatsen, waar ijzer kan worden gebonden en met de vraag of deze plaatsen identiek zijn. Is er geen interactie en zijn de plaatsen identiek, dan zou  $\bar{K}_2 = 1/4 \bar{K}_1$ , want  $R$  is dan 1.

In dat geval geldt:

$$K_1' = \frac{2}{Rm(2-r)} \left( (r-1) \pm \sqrt{(r-1)^2 + r(2-r)R} \right)$$

Teneinde deze berekening uit te voeren moet  $m$  bekend zijn. Deze is af te leiden uit de  $[Fe(III)]$  aan de zijde van het membraan waar geen eiwit zit en met behulp van de evenwichtsconstanten van de chelaten. Als de gevonden gemiddelde waarde voor  $\bar{K}_1$  geven de auteurs op:  $\log \bar{K}_1 = 2,96$ , waaruit

volgt dat  $\log \bar{K}_2 = 2,36$ . De gegevens zijn niet nauwkeurig genoeg om na te gaan of R inderdaad 1 is, dus  $\bar{K}_2 = 1/4 \bar{K}_1$  tengevolge van zuiver statistische overwegingen. De gegevens van Aasa en medewerkers zijn in strijd met die van Davis en anderen. Indien in aanmerking genomen wordt dat bij Davis de aanduidingen  $K_2$  gebruikt worden voor de eerste stap en  $K_1$  voor de tweede stap, en dat bovendien  $K_1$  en  $K_2$  van Davis omgekeerd evenredig zijn met  $\bar{K}_2$  respectievelijk  $\bar{K}_1$  van Aasa, kan indien  $\bar{K}_2$  en  $\bar{K}_1$  gebruikt worden in de zin van Aasa, worden gesteld op grond van de waarnemingen van Davis dat  $K_2$  een factor 1000 kleiner zou zijn dan  $K_1$ . Aasa wijt deze discrepantie aan het feit dat bij de proeven van Davis nog lang geen evenwicht was bereikt. De proeven van Davis e.a. duurden 45 uur, daartegenover de proeven van Aasa tot 3 weken. De opvatting van Aasa c.s.<sup>40)</sup> volgens welke  $\bar{K}_1$  en  $\bar{K}_2$  van dezelfde orde van grootte zijn, komt niet overeen met de voorstelling die Warner en Weber<sup>41)</sup> van de ijzerbinding aan conalbumine geven,  $K_2$  zou daarbij ongeveer  $100 \times K_1$  bedragen.

Opgemerkt moet worden dat de experimentele gegevens van Aasa zodanig zijn weergegeven, dat het moeilijk is de berekeningen die tot  $\bar{K}_1$  en  $\bar{K}_2$  leiden te reproduceren. Dit geldt in het bijzonder voor de proeven met citraat. Het is zeer te betreuren dat de auteurs te summier ingaan op de experimentele gegevens betreffende de bicarbonaatconcentratie. Immers enige jaren later, in 1967, gaf deze groep onderzoekers<sup>44)</sup> de mening op, dat  $\text{HCO}_3^-$  in de evenwichtsvergelijkingen van de twee reacties tussen ijzer en transferrine niet thuishoort. Maar daarmee was tevens iedere grondslag voor hun berekende  $\bar{K}_1$  en  $\bar{K}_2$  verdwenen, de opgegeven waarden zijn waardeveloos. De experimentele gegevens van deze werkgroep zouden alsnog nuttig gebruikt kunnen worden voor het berekenen van  $K_1'$  en  $K_2'$ , de "schijnbare" evenwichtsconstanten waarvan sprake was. Hier stoot men nu op genoemd euvel, een te summiere opgave van experimentele gegevens. Aangezien voor ons de berekening van  $K_1'$  en  $K_2'$  van veel betekenis lijkt, omdat op deze wijze vergelijkingsmateriaal voor de door ons te bepalen evenwichtsconstanten zou kunnen worden verkregen, probeerden wij tot een zo goed mogelijke reconstructie te komen. Daarbij maakten wij gebruik van de gegevens betreffende  $\text{HCO}_3^-$ -concentraties in diverse milieu's die vermeld staan in de literatuur waarnaar Aasa verwijst<sup>68)</sup>. Deze staan weergegeven in tabel I-3.

Tabel I-3

Omgerekende K-waarden op grond van gegevens van Aasa c.s.<sup>43)</sup>.

Gebruikte chelaatvorm	pH	$[\text{HCO}_3^-]$ mol/l	$\bar{K}_1$	$\bar{K}_2$	$K_1'$	$K_2'$
EDTA	9	$5 \times 10^{-2}$	$10^3$	$0,25 \times 10^2$	$5,00 \times 10^{28}$	$1,25 \times 10^{28}$
Citraat	6,5	$5 \times 10^{-5}$	$3 \times 10^3$	$0,75 \times 10^2$	$3,60 \times 10^{18}$	$0,90 \times 10^{17}$

Gebruik werd gemaakt van het gegeven  $\bar{K}_1 = 4 \times \bar{K}_2$  en  $K_1' = 4 \times K_2'$ .

## DE REACTIE TUSSEN IJZER EN TRANSFERRINE

Het heeft, zoals in dit hoofdstuk reeds werd vermeld, spoedig de aandacht getrokken dat de reactie tussen transferrine en ijzer zowel tot stand komt met Fe (II) als met Fe (III). Rath en Finch<sup>9)</sup> en Ross e.a.<sup>42)</sup> stelden vast dat er spectrofotometrisch geen verschil te constateren valt tussen het ijzertransferrine complex ontstaan uit Fe (II) en het complex ontstaan uit Fe (III). Michaelis bewees reeds met de meting van de magnetische susceptibiliteit dat ook vanuit dat gezichtspunt bekeken geen verschil tussen uit Fe (II) en Fe (III) ontstane complexen te constateren valt.

Het feit dat in het ijzertransferrine complex het ijzer in driewaardige vorm voorkomt, betekent dat bij de reactie met Fe (II) een overgang naar de driewaardige vorm moet plaatsvinden. Koechlin<sup>21)</sup> suggereerde een auto-oxidatie van Fe (II), voorafgaand aan de binding van ijzer aan transferrine. In dit verband zijn de onderzoeken van Ross en medewerkers<sup>42)</sup> niet zonder betekenis. Deze auteurs deden als eersten kwantitatieve onderzoeken over de reactiesnelheid van de omzetting van ijzer met transferrine tot ijzertransferrine. Zij registreerden de omzetting van ijzer en transferrine tot ijzer-transferrine door het meten van de absorptie bij 470 nm in de tijd. Hieruit concludeerden zij dat op ieder moment de concentratie aan vrij ijzer en vrij transferrine berekend kan worden. Deze beide concentraties berekenden zij als volgt.

Door gebruik te maken van de gemeten extinctie bij 470 nm en de molaire extinctie-coëfficiënt van  $\text{TrFe}_2$  bij deze golflengte, bepaalden zij  $[\text{TrFe}_2]$ . Door deze concentratie af te trekken van de uitgangsconcentraties kwamen zij tot  $[\text{Tr}]$  en  $[\text{Fe}]$ .

Indien de logaritme van het quotient van de concentraties van vrij

transferrine, respectievelijk vrij ijzer, uitgedrukt in mmol/l tegen de tijd in seconden werd uitgezet, ontstond ten naaste bij een rechte lijn. Ross c.s. leidden hieruit af dat de "overall" reactie  $\text{Tr} + 2\text{Fe} \rightarrow \text{TrFe}_2$  een tweede orde reactie zou zijn met een arbitraire reactieconstante  $K_t$  die als volgt te berekenen zou zijn:

$$K_t = \frac{2,303}{t(2a - b)} \log \frac{b(a - x)}{a(b - 2x)}$$

hierin zijn a en b de begin concentraties van de reagerende stoffen en x is de concentratie van het gevormde produkt op tijdstip t, als de reactiesnelheid wordt uitgedrukt in mmol/l per seconde.

Op deze werkwijze hebben wij enige kritiek, in die zin dat volgens ons Ross e.a. de veronderstelling dat het een tweede orde reactie is, met de aangegeven vergelijking in hun berekening invoeren door de wijze waarop  $[\text{Fe}]$  en  $[\text{Tr}]$  worden berekend. Het is dan ook niet zo te verwonderen dat Ross c.s. een rechte lijn vinden bij hun grafische weergave van de logaritme van het quotient van  $[\text{Tr}]$  en  $[\text{Fe}]$  en de tijd. Wij willen hun bewijsvoering, dat transferrine met ijzer volgens een eentrapsreactie reageert, zoals aangegeven, niet zonder meer aanvaarden.

De auteurs geven op dat  $K_t$  voor de reactie tussen Fe (II) en transferrine bij  $25^\circ \text{C}$  en pH 7.2 en in aanwezigheid van overmaat bicarbonaat, van de orde van grootte van 0,6 mmol/l per seconde is. Vastgesteld werd dat bicarbonaat een sterk versnellende invloed heeft. De reactiesnelheid nam door dit anion toe totdat het quotient van de concentraties bicarbonaat en ijzer de waarde van 50 had bereikt. De snelheid was dan met een factor 2 à 3 toegenomen. Toevoeging van meer bicarbonaat bleef zonder effect. De pH heeft een grote invloed op de reactiesnelheid, bij pH 7,5 is deze 4 à 5 maal zo groot als bij pH 7,0.

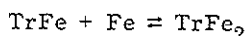
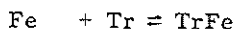
Volgens Ross en medewerkers is de reactie tussen transferrine en Fe (III) aanvankelijk sneller dan de reactie tussen transferrine en Fe (II). De reactie met Fe (III) gaat echter niet verder dan tot 70-85% verzadiging. De reactieconstante voor de omzetting met Fe (III) konden Ross en medewerkers niet berekenen, de experimentele gegevens van deze reactie waren te wisselvallig. In dit verband is het nuttig te wijzen op de gegevens van Surgenor e.a.<sup>17)</sup> volgens welke Fe (II) sneller met transferrine reageert dan Fe (III). Zowel Surgenor als Ross wijzen op de hydrolyse van Fe (III)-

zouten en het ontstaan van  $\text{Fe}(\text{OH})_3$ , hetgeen een grote invloed heeft op de Fe (III) concentratie.

Ross c.s. constateerden dat toevoeging van  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  vlak voordat of vlak nadat de reactie tussen transferrine en Fe (II) was begonnen, tot een onmiddellijke vorming van het ijzertransferrine complex voor 100% leidde. Zij schrijven dit toe aan een omzetting van Fe (II) in Fe (III) zonder dat hydrolyse van Fe (III) kan optreden.

Vermeldenswaard is nog een enkel aanvullend gegeven dat Ross c.s. verkregen. Toevoeging van reducerende stoffen als hydrazine had geen invloed op de reactiesnelheid van Fe (II) met transferrine. De conclusie van de auteurs is dat de oxidatie van Fe (II) tot Fe (III) niet afhankelijk is van een mechanisme dat los van het transferrine staat. Op grond van gegevens over het vermogen van histidine en de imidazol-groep om boven pH 6,5 Fe (II) om te zetten in Fe (III), concluderen Ross c.s. dat waarschijnlijk de omzetting van twee- in driewaardig ijzer in het geval van de reactie transferrine + Fe (II) plaatsvindt na de binding van het ijzer aan transferrine. Deze aan transferrine plaatsvindende omzetting zou de snelheidsbepalende stap zijn van het systeem  $2\text{Fe}(\text{II}) + \text{Tr} \rightarrow \text{TrFe}_2$ , omdat het de langzaamste omzetting zou zijn.

Het onderzoek van Ross c.s. heeft ongetwijfeld een aantal belangwekkende gegevens opgeleverd. Desondanks kan worden gesteld dat onze kennis omtrent het reactiemechanisme van de omzettingen



zeer beperkt is.

## HOOFDSTUK II

### MATERIALEN EN METHODEN

#### Transferrine

#### UITGANGSSTOF EN ZUIVERING

Humaan transferrine werd verkregen van de firma A.B. KABI (Zweden) in de lyophil gedroogde vorm. De zuiverheid wordt door deze firma opgegeven als zijnde meer dan 90%.

Dit transferrine werd altijd opgelost in een fosfaatbuffer 0,05 molair pH 7,4, waaraan was toegevoegd natriumchloride (0,155 mol/l = 0,9%). Deze oplossing had een rode kleur omdat het transferrine-ijzer bevat. Het was dus in het algemeen noodzakelijk dit ijzer te verwijderen teneinde de transferrine oplossing te kunnen gebruiken.

Om het genoemde eiwit vrij te maken van ijzer werd genoemde oplossing van transferrine tweemaal 24 uur gedialyseerd tegen een EDTA/acetaatbuffer (0,02 molair EDTA/0,05 molaire acetaatoplossing pH 5,0). Hierna volgde een dialyse gedurende 12 uur waarbij de EDTA/acetaatoplossing vervangen werd door aqua bidest. Nogmaals tweemaal 24 uur werd gedialyseerd tegen de 0,05 molaire fosfaatbuffer pH 7,4 waaraan natriumchloride was toegevoegd (0,155 mol/l). De zuiverheid van de gebruikte transferrine-oplossingen werd gecontroleerd met zetmeel-electroforese en chromatografie met een DEAE-cellulose kolom. Er werden geen bijmengsels gevonden. De ijzer-vrijgemaakte transferrine-oplossingen werden steeds gecontroleerd op de eventuele aanwezigheid van ijzer. De ijzerconcentratie bedroeg hierbij nooit meer dan 1  $\mu$ mol per 1000  $\mu$ mol transferrine. Ook werden bij verschillende experimenten

humane sera als uitgangsstof voor transferrine gebruikt. Deze sera werden verkregen van het Centraal Klinisch-Chemisch Laboratorium van het Academisch Ziekenhuis Dijkzicht. Van deze sera werden de transferrine-gehalten bepaald volgens de methode b. die hieronder beschreven zal worden.

Deze sera werden op twee manieren gebruikt:

1. Zonder verdere behandeling.
2. Met een verdere behandeling, die bestond uit het ijzer vrijmaken volgens de methode die voor transferrine beschreven is.

Hierbij werd niet alleen het ijzer, maar ook de laag-moleculaire bestanddelen van serum verwijderd.

#### BEPALINGSMETHODEN VAN TRANSFERRINE

Het transferrine-gehalte werd bepaald volgens drie methoden:

- a. De biureetmethode, beschreven door Cornall e.a.<sup>60)</sup>. De eiwitconcentratie van de te onderzoeken oplossing moet hierbij 125-700  $\mu\text{mol}$  per liter bedragen. Bij te hoge concentratie werd verdund met een natriumchloride-oplossing (0,155 mol/l).
- b. De radiale immunodiffusiemethode, ontwikkeld door Mancini en Heremans<sup>61)</sup>. Hiervoor werden transferrine-partiëen-immunodiffusie-platen van Behringwerke A. G. (Duitsland) gebruikt, die een specifieke transferrine-bepaling mogelijk maken.

Het bereik van deze bepalingsmethode bedraagt 2,5-7,5  $\mu\text{mol/l}$ .

Monsters met te hoge eiwitconcentraties werden ook hier verdund met een natriumchloride-oplossing (0,155 mol/l). Als standaardoplossing werd gebruikt een gestabiliseerd humaan serum van Behringwerke A. G. dat 18,75  $\mu\text{mol/l}$  aan transferrine bevat. Deze firma geeft als concentratie 140 mg% op. Met behulp van de relatieve molecuulmassa van 80.000 werd dit door ons in de opgegeven waarde omgerekend. Van dit serum werden drie verdunningen gemaakt, te weten, 3, 6, 9 maal verdund met behulp van de NaCl-oplossing. Deze werden tegelijkertijd met de te onderzoeken monsters op dezelfde platen opgebracht.

Zowel bij de biureetmethode als bij de immunochemische methode werden de analyses in duplo uitgevoerd.

De waarden, die met beide methoden werden gevonden, verschilden onderling steeds 5% met dien verstande, dat de biureetmethode hogere waarden leverde.



c. De methode die gebruik maakt van de optische meting bij 280 nm.

Deze berust op het bekend zijn van de extinctie-coëfficiëntie bij 280 nm van 1% oplossingen van ijzervrij-transferrine en van met ijzer verzadigd transferrine. Deze bedragen respectievelijk 13,8 en 11,2<sup>70)</sup>. Met behulp van de relatieve molecuulmassa van 80.000 berekenden wij voor de molaire extinctie-coëfficiënten 11.200 en 8.960 voor de beide eiwit-oplossingen, bij 280 nm.

Aangezien de nauwkeurigheid van deze methode geringer is dan die van de beide andere, werd c. als orienterende bepaling gebruikt wegens de eenvoud.

## VERZADIGINGSMETHODE VAN TRANSFERRINE MET IJZER

Bij diverse experimenten werd gebruik gemaakt van met ijzer verzadigd transferrine. Dit geschiedde volgens de methode van Ramsay<sup>62)</sup>. Hierbij werd aan een transferrine-oplossing, waarvan de eiwitconcentratie bij benadering bekend was, een grote overmaat ijzer (II) toegevoegd. Na 1½ uur werd de hoeveelheid niet-gebonden ijzer verwijderd door middel van het uitschudden van de oplossing met  $\text{MgCO}_3$  (10 mmol/l). Vervolgens werd het  $\text{MgCO}_3$ , waaraan het niet-gebonden ijzer geadsorbeerd was, verwijderd door de suspensie te centrifugeren bij 3000 g. Van de eiwit-oplossing werd vervolgens het transferrine- en ijzergehalte bepaald, zodat de verzadiging berekend kon worden. Deze bleek, met bovengenoemde methode, vrijwel altijd tussen 98 en 100% te liggen. Voor het verzadigen van serum met ijzer werd dezelfde methode gebruikt.

## IJzer

## GEBRUIKTE ZOUTEN EN DE BEPALINGSTECHNIEKEN\*

Voor het maken van de ijzerbevattende oplossingen werd uitgegaan van Mohr's zout of  $\text{FeSO}_4$  indien een Fe (II) oplossing en van  $\text{FeCl}_3$  als een Fe (III) oplossing moest worden bereid.

Gebruikt werden de reagentia van Merck p.a. Bereid werden zowel

\* Het door ons gebruikte glaswerk werd ijzervrij gemaakt via een wasprocedure met een bichromaats oplossing en aqua bidest.

voor Fe (II) als Fe (III) geconcentreerde oplossingen (32 mmol/l) die als stock-oplossingen fungeerden en waaruit een bepaald volume werd gehaald teneinde bij verdunning de gewenste ijzerconcentraties te verkrijgen.

IJzer werd bepaald volgens de methode van Trinder<sup>63)</sup>, waarbij bathophenantrolinedisulfonzuur-Na-zout als kleurreagens werd gebruikt. Gezorgd werd, dat de te verwachten ijzerconcentratie 10-50  $\mu\text{mol/l}$  bedroeg. Bij te hoge ijzerconcentraties werd verdund met aqua bidest.

Tevens werd ijzer bepaald met behulp van de atomaire absorptie-spectrofotometer volgens de methode van Zettner e. a.<sup>64)</sup>. Wij gebruikten de modificatie zoals deze door Blijenberg<sup>64a)</sup> is aangebracht. Met deze techniek kunnen ijzerconcentraties van 10-70  $\mu\text{mol/l}$  bepaald worden. Monsters met te hoge concentraties werden ook hier verdund met aqua bidest. Bij de beide ijzerbepalingen werd gebruik gemaakt van een Beckmann D. U.-2 spectrofotometer, in het tweede geval uitgerust met een atoom-absorptieopzet.

De resultaten van de beide beschreven methoden werden meermalen met elkaar vergeleken en er bleek geen verschil in de gevonden waarden te bestaan.

Aangezien de methode met bathophenantrolinedisulfonzuur-Na-zout eenvoudiger uit te voeren was, werd deze het meest gebruikt bij het in dit proefschrift beschreven onderzoek.

## RADIOACTIEF IJZER

Het bij de experimenten gebruikte Fe-59 werd verkregen als  $\text{FeCl}_3$  van N.V. Philips Duphar. Bij de proeven waarbij met Fe (II) oplossingen werd gewerkt, werd het Fe-59 gereduceerd met ascorbinezuur en vervolgens vermengd met de Fe-56 oplossing. Bij proeven met Fe (III) bleef deze procedure achterwege. Bij de meeste experimenten bedroeg de toegevoegde radioactiviteit 1-5  $\mu\text{C}$  per liter.

Deze radioactiviteit werd gemeten met een Philips  $\gamma$ -teller, voorzien van een sample changer, PW9025-PW4280. Tevens werd steeds het ijzergehalte langs chemische weg bepaald, zodat de specifieke activiteit berekend kon worden. Deze zal in het volgende opgegeven worden als het aantal tellen per 100 seconden per  $\mu\text{mol/l}$ .

## GEBRUIKTE BUFFER

Voor een groot gedeelte van de experimenten werd de reeds eerder genoemde 0,05 molaire fosfaatbuffer pH 7,4 gebruikt. Deze werd verkregen door 800 ml secundair fosfaat-oplossing ( $0,1 \text{ mol/l}$ ) te vermengen met 200 ml primair fosfaat-oplossing ( $0,1 \text{ mol/l}$ ) en vervolgens te verdunnen met 1 liter aqua bidest. Aan deze 0,05 molaire buffer werd altijd natriumchloride toegevoegd ( $0,155 \text{ mol/l}$ ). Bij een aantal experimenten werd de buffer niet verdund, zodat de concentratie  $0,1 \text{ mol/l}$  bleef, dan werd aan deze buffer  $0,31 \text{ mol/l}$  NaCl toegevoegd. De pH metingen van deze buffer en van alle verder te noemen oplossingen werden uitgevoerd met een pH meter van Radiometer (Kopenhagen) type 23 en met Lyphan papier.

## GEBRUIKTE REDUCTANTIA EN BICARBONAAT

Bij de experimenten waarbij ijzer als Fe (II) was toegevoegd, werden aan de buffer ascorbinezuur of natriumsulfiet (beide  $3 \text{ mmol/l}$ ) toegevoegd. Waar nodig werd bicarbonaat toegevoegd als natriumbicarbonaat, zodanig dat de eindconcentratie steeds  $25 \text{ mmol/l}$  bedroeg.

## BIJZONDERHEDEN BETREFFENDE DE WERKWIJZE DIE BIJ DE DIALYSE GEVOLGD WERD

De hoofdpunten van de wijze waarop de dialyseproeven werden uitgevoerd, staan beschreven in hoofdstuk III. Uitgaande hiervan en van de in genoemd hoofdstuk weergegeven opstelling, zullen in het hiernavolgende de details van de werkwijze worden behandeld.

De dialyse werd uitgevoerd met een aan beide zijden dichtgeknoopte Visking-slang waarin 20 ml vloeistof gebracht was, verder genoemd binnenvloeistof. Deze slang, met een diameter van 24 mm, werd voor gebruik gedurende 1 uur voorgeweekt in aqua bidest, en vervolgens in de fosfaatbuffer gebracht totdat de opstelling gereed was voor het experiment. Van deze slang (ongeveer 8 cm lengte) werd het ijzergehalte gecontroleerd; dit bleek verwaarloosbaar klein te zijn. De slang werd in een erlenmeijer of bekerglas van 1 l geplaatst waarin 500 ml of 110 ml dialyse vloeistof was gebracht, verder buitenvloeistof genoemd. Deze buitenvloeistof werd van de lucht afgeschermd door met parafilm en aluminiumfolie het reactievat

af te sluiten. Bij de dialyseproeven waarbij waterstofgas werd doorgeleid, werd gebruik gemaakt van een erlenmeijer van 1 l waarvan de afsluitstop dubbel doorboord was, waardoor het gas in het reactievat gebracht en vervolgens afgevoerd kon worden.

Wanneer de temperatuur, waarbij de dialyse plaatsvond,  $25^{\circ}\text{C}$  of  $37^{\circ}\text{C}$  bedroeg, werd het reactievat in een waterbad van genoemde temperatuur geplaatst. In het algemeen bedroeg de dialysetijd 64-72 uur.

De menging van de buitenvloeistof gedurende de dialyse geschiedde met behulp van een magnetische roering in het reactievat of door een serie reactievaten op een schudmachine te plaatsen.

Voor en na de dialyse werd het gewicht van de zakjes gecontroleerd. Het volume-verschil, dat hieruit berekend kon worden, bleek vrijwel nooit meer dan 4% te bedragen. Zo nodig werd een correctie op de uitkomsten aangebracht met behulp van de gemeten volume-verandering.

Na afloop van de experimenten werd het zakje uit de buitenvloeistof gehaald, afgespoeld met aqua bidest, en opgeknipt. De inhoud werd opgevangen in ijzervrij gemaakt glaswerk en vervolgens aangezuurd met enkele druppels geconcentreerd zwavelzuur. Ook de buitenvloeistof werd aangezuurd op dezelfde wijze.

IJzer werd bepaald in de buitenvloeistof voor en na de dialyse en in de binnenvloeistof na dialyse. Het transferrinegehalte werd bepaald voor en na de dialyse met de beide methoden genoemd onder a. en b. in het onderdeel over de transferrine-bepalingsmethode.

De buitenvloeistof werd voor de dialyse-experimenten waarbij met ascorbinezuur of natriumsulfiet werd gewerkt en waarbij vanuit de buitenvloeistof transferrine met ijzer werd opgeladen, als volgt bereid.

In een maatkolf van 500 ml werd 1-10 ml van de genoemde geconcentreerde ijzer (II) oplossing gebracht en wel zoveel, dat de gewenste concentratie Fe (II) per liter werd verkregen. Aan deze oplossing werd 10 ml van een ascorbinezuur of 10 ml natriumsulfiet-oplossing (beide 0,3 mol/l) toegevoegd. De concentratie aan beide reductantia zal dus in de uiteindelijke opstelling 6 mmol/l bedragen. Vervolgens werd 50 ml natriumchloride-oplossing (1,55 mol/l) toegevoegd en met aqua bidest. tot 250 ml aangevuld. De maatkolf werd verder aangevuld met 0,1 molaire fosfaatbuffer pH 7,4.

Deze hierboven geschetste volgorde bleek belangrijk te zijn bij deze experimenten. Wij bemerkten, dat bij afwijking van deze volgorde neerslagen ontstonden en dat de dialyse-experimenten niet meer uitvoerbaar

waren. De bereidingswijze van de buitenvloeistof behorende bij de dialyse-experimenten, waarbij waterstofgas werd doorgeleid, zal besproken worden in hoofdstuk III.

De binnenvloeistof werd, wanneer geen transferrine aanwezig was, op dezelfde wijze bereid als de buitenvloeistof, uiteraard op de ijzertoevoeging na. Dit betreft de zogenaamde blanco-experimenten. Bij de experimenten waarbij transferrine aanwezig moest zijn, werd de binnenvloeistof bereid door een geconcentreerde transferrine-oplossing ( $800 \mu\text{mol/l}$ ) te verdunnen met de 0,05 molaire fosfaatbuffer waaraan natriumchloride ( $0,155 \text{ mol/l}$ ) en ascorbinezuur of natriumsulfiet ( $6 \text{ mmol/l}$ ) was toegevoegd. Ook werden dialyse-experimenten uitgevoerd met een transferrine-oplossing die met ijzer volgens de reeds beschreven methode was verzadigd. In de buitenvloeistof was hierbij meestal geen ijzer aanwezig. Wanneer dit wel het geval was, werd de hierboven beschreven werkwijze gevolgd.

De experimenten waarbij serum als binnenvloeistof werd gebruikt, werden op identieke wijze als die met transferrine uitgevoerd.

#### OPTISCHE MEETMETHODEN

Bij de bespreking van de ijzerbepalingstechnieken werd vermeld dat de Beckmann D.U.-2 spectrofotometer werd gebruikt. Voor het opnemen van de diverse optische spectra van het ijzer-transferrine complex maakten wij gebruik van een Beckmann D.B. spectrofotometer met een zelfregistrerende recorder. Hierbij werden micro-kwartscuvetten gebruikt met een optische weglengte van 1 cm.

De metingen bij 470 nm werden op ons laboratorium uitgevoerd met een Zeiss spectrofotometer type PMQ II bij  $20^{\circ} \text{ C}$ .

De "stopped-flow" experimenten werden uitgevoerd met behulp van een Durrum-Gibson Stopped-Flow spectrofotometer, ingesteld op een temperatuur van  $37^{\circ} \text{ C}$ . Het spectrofotometer gedeelte was zodanig afgesteld, dat extinctiemetingen bij 470 nm mogelijk waren. Het door ons gebruikte apparaat stond ons ter beschikking op het laboratorium voor Biochemie van de Landbouw Hogeschool te Wageningen (Hoofd van het Laboratorium: Prof. Dr. C. Veeger).

## ELECTRONSPIN RESONANTIE-METINGEN

Deze metingen werden uitgevoerd met een Varian 4502-12 X-band spectrometer bij 9150 MHz. Wij voerden deze metingen uit op zo'n apparaat aanwezig in het laboratorium voor Kristalchemie van de Rijksuniversiteit te Utrecht (Hoofd van het laboratorium: Prof. M.P. Groeneweg). De temperatuur bedroeg 77°K. In hoofdstuk V wordt de methode beschreven, waarop de monsters bereid werden voordat de spectra opgenomen konden worden. De kwantitatieve berekening van het ijzergehalte van de monsters dat met de E.S.R.-methode kon worden bepaald, verliep als volgt.

Een aantal monsters, waarvan het transferrine-gehalte bekend was, werd met ijzer, Fe (II), verzadigd. Deze verzadigingsgraad werd gecontroleerd met behulp van de  $E_{470 \text{ nm}}$  en met de reeds beschreven methode van Ramsay. Na vriesdrogen werden van deze monsters de spectra opgenomen en de piekhoogten vastgesteld. Door deze te corrigeren met het vulgewicht en vulhoogte van de monsterbuisjes ontstond een soort standaardcurve waarmee het ijzergehalte van de overige monsters berekend kon worden.

De ijzer- en transferrine-gehalten werden bepaald en uitgedrukt per gram droge stof volgens de reeds besproken bepalingsmethoden voor beide componenten.

## METHODEN WAAROP DE DIVERSE BEREKENINGEN WERDEN UITGEVOERD

### a. Berekening van de dissociatieconstanten

Deze werden op twee manieren uitgevoerd:

1. Met behulp van een computerprogramma door ons geschreven in FORTRAN IV en uitgevoerd op de Philips P9202 computer, die aanwezig is in het Centraal Klinisch-Chemisch Laboratorium van het Academisch Ziekenhuis Dijkzigt. De berekeningen berustten op het verwerken van een wiskundige uitdrukking, die in hoofdstuk III wordt afgeleid. In deze vergelijking ([13]\* in betreffend hoofdstuk) werden paarsgewijze de resultaten van twee experimenten gesubstitueerd. De waarden voor de beide dissociatieconstanten werden door de computer berekend. Het programma was zo opgezet, dat de resultaten van een groot aantal experimenten ingevoerd

\* In dit proefschrift worden de vergelijkingen aangegeven met nummers en rechte haakjes.

werden, waarna de computer deze gegevens zelf paarsgewijze achter-eenvolgens afwerkte en de waarden van de dissociatieconstanten uitvoerde.

## 2. Met behulp van een Friden laboratoriumtafel rekenmachine.

De berekeningen van de dissociatieconstanten werden in dit geval uitgerekend door uit te gaan van vergelijking [17], eveneens afgeleid in hoofdstuk III. In principe was de gevolgde methode dezelfde als hierboven vermeld, maar aangezien het oplossen van [17] eenvoudiger was, kon met een tafelrekenmachine worden volstaan.

## b. Berekeningen van de reactieconstanten

De proeven, die werden uitgevoerd om de experimentele gegevens voor deze berekeningen te verkrijgen, geschieden met de reeds genoemde Durrum-Gibson Stopped-Flow spectrofotometer.

Het reactieverloop in de tijd wordt bij dit apparaat vastgelegd op een oscilloscoop die dit verloop gedurende een tijd kan vasthouden. Van het scherm, waarop dergelijke curves zichtbaar waren, werden foto's gemaakt. De curves op deze foto's waarop het transmissieverloop in de tijd van transferrine-ijzer oplossingen vastgelegd was, werden omgerekend naar extinctieveranderingen in de tijd met behulp van een omrekeningstabel. Deze veranderingen werden grafisch weergegeven.

De berekeningen geschieden met een computerprogramma en werden uitgevoerd op dezelfde rekenmachine als onder a.1 vermeld. In hoofdstuk VI worden twee vergelijkingen afgeleid ( $[a]$  en  $[b]$ ), die de veranderingen van transferrine en ijzer in de tijd aangeven. Deze twee vergelijkingen kunnen door de computer opgelost worden volgens de methode van Runge-Kutta, wanneer de diverse gegevens ingevoerd zijn. De reactieconstanten worden hierbij door ons zelf gekozen. In het programma waren ook vergelijkingen [7], [8] en [18] opgenomen, zodat tegelijkertijd de verandering van de extinctie in de tijd berekend kon worden.

Het programma was zodanig opgesteld, dat deze verandering in de tijd door de computer grafisch weergegeven kon worden, "geplot" op een line-printer. Dit programma is weergegeven in het aanhangsel.

Deze berekende curves werden vergeleken met de experimenteel gevonden grafieken. Door nu diverse series reactieconstanten in te voeren, werd op deze manier een indruk verkregen van de waarden van deze constanten voor het systeem.

Het verwerken van het programma en de invoergegevens op de computer werd voor ons uitgevoerd door mejuffrouw A. Casteleijn en de heer C. Bernard.

#### OPGAVEN VAN DE STANDAARDAFWIJKINGEN BIJ DE DIVERSE METHODEN

Deze werden berekend uit een tiental duplo-bepalingen.

- a. Transferrine-bepalingen 5%
- b. IJzerbepalingen 5%
- c. Volume-metingen 4%
- d. Extinctie-metingen 4%
- e. Omzetting van transmissie naar extinctie 5%
- f. Bepaling van het ijzergehalte met behulp van de ESR-spectrofotometer 20%.

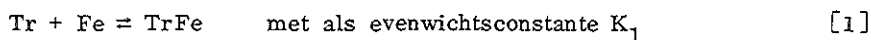


### HOOFDSTUK III

#### BEPALING VAN DE EVENWICHTSCONSTANTEN DOOR MIDDEL VAN DIALYSE- EXPERIMENTEN

##### INLEIDING

Zoals in het eerste hoofdstuk werd uiteengezet spreken de meeste argumenten, afgeleid uit de resultaten van de experimenten uitgevoerd met transferrine en ijzer, ten gunste van het volgende systeem:



Op de toestand van het ijzer, dat bij de reactie betrokken is, wordt later ingegaan.

De waarden van de evenwichtsconstanten, die hierbij behoren kunnen op de volgende wijze beschreven worden:

$$K_1 = \frac{[\text{TrFe}]}{[\text{Tr}][\text{Fe}]} \quad [3]$$

$$K_2 = \frac{[\text{TrFe}_2]}{[\text{TrFe}][\text{Fe}]} \quad [4]$$

Hierbij zijn respectievelijk: [Tr] concentratie transferrine in mol/l  
[Fe] concentratie ijzer in mol/l  
[TrFe] concentratie transf. met 1 ijzeratoom  
in mol/l

[TrFe<sub>2</sub>] concentratie transf. met 2 ijzeratomen  
in mol/l

Voor de berekeningen van deze twee constanten, uit de gegevens verkregen met een experiment, is het noodzakelijk, dat de concentraties van de vier hierboven genoemde componenten bepaald moeten kunnen worden zonder dat de evenwichtstoestand verstoord wordt. Het is te verwachten, dat [Fe] laag zal zijn in vergelijking met [TrFe] en [TrFe<sub>2</sub>]. Voor een directe meting van [Fe] bestaan bovendien geen mogelijkheden. Het ligt wel voor de hand een kunstgreep toe te passen door van een twee compartimenten systeem gebruik te maken en wel van een dialyseopzet. Wanneer het gekozen membraan voor ijzer vrij doorgankelijk is en ondoorgankelijk is voor transferrine en de beide transferrine-ijzer complexen, dan is [Fe] in de buitenvloeistof zonder complicaties te bepalen. Wanneer aan bepaalde omstandigheden is voldaan dan zal [Fe] buiten gelijk zijn aan [Fe] binnen.

Het regelrecht bepalen van [Tr] is niet doenlijk, evenmin kunnen [TrFe] en [TrFe<sub>2</sub>] afzonderlijk worden gemeten. Wel kunnen deze drie componenten worden gescheiden m.b.v. de reeds genoemde electrofocussing techniek, maar dan wordt het evenwicht verstoord. Het bepalen van [TrFe] en [TrFe<sub>2</sub>] tezamen is wel mogelijk door middel van extinctiemetingen bij 470 nm. Ook [Tr] totaal als som van [Tr], [TrFe] en [TrFe<sub>2</sub>] is bepaalbaar met een immunochemische techniek. [Fe] kan dus ook worden afgeleid uit het verschil tussen [Tr] totaal en [TrFe] + [TrFe<sub>2</sub>] en tevens uit het verschil tussen [Fe] totaal en de som van de concentraties van beide complexen. In het volgende hoofdstuk wordt hierop uitvoerig ingegaan.

Het blijkt dus onmogelijk per experiment K<sub>1</sub> en K<sub>2</sub> te berekenen, omdat van de vier noodzakelijke grootheden er slechts één, en dan nog wel met een kunstgreep, meetbaar is. Het is dus noodzakelijk uit bovengenoemde formules van de evenwichtsconstanten een vergelijking af te leiden waarin het verband tussen K<sub>1</sub> respectievelijk K<sub>2</sub> en de meetbare grootheden [Fe], [Fe]<sub>totaal</sub> en [Tr]<sub>totaal</sub> zodanig wordt beschreven, dat berekening op grond van een samenhangende serie experimenten mogelijk wordt. Dit kan op de volgende wijze geschieden. (Een tweede methode wordt verderop in dit hoofdstuk besproken).

$$K_1 = \frac{[\text{TrFe}]}{[\text{Tr}][\text{Fe}]} \quad [3]$$

$$K_2 = \frac{[\text{TrFe}_2]}{[\text{TrFe}][\text{Fe}]} \quad [4]$$

Verder geldt voor het systeem met betrekking tot de ijzer- respectievelijk transferrinebalans:

$$\text{conc. totaal ijzer} = [\text{Fe}_\text{o}] = [\text{Fe}] + [\text{TrFe}] + 2[\text{TrFe}_2] \quad [5]$$

$$\text{conc. totaal transf.} = [\text{Tr}_\text{o}] = [\text{Tr}] + [\text{TrFe}] + [\text{TrFe}_2] \quad [6]$$

Uit [5] en [6] volgt:

$$[\text{TrFe}] = -2[\text{Tr}] + [\text{Fe}] + 2[\text{Tr}_\text{o}] - [\text{Fe}_\text{o}] \quad [7]$$

$$[\text{TrFe}_2] = [\text{Fe}_\text{o}] - [\text{Fe}] - [\text{Tr}_\text{o}] + [\text{Tr}] \quad [8]$$

Door deze bewerkingen zijn de concentraties van de beide transferrine-ijzer complexen reeds uitgedrukt in  $[\text{Tr}_\text{o}]$ ,  $[\text{Fe}_\text{o}]$ ,  $[\text{Tr}]$  en  $[\text{Fe}]$ :

[7] en [8] ingevuld in [3] en [4] geeft:

$$K_1 = \frac{-2[\text{Tr}] + [\text{Fe}] + 2[\text{Tr}_\text{o}] - [\text{Fe}_\text{o}]}{[\text{Tr}][\text{Fe}]} \quad [9]$$

$$K_2 = \frac{[\text{Fe}_\text{o}] - [\text{Fe}] - [\text{Tr}_\text{o}] + [\text{Tr}]}{[\text{Fe}] \{-2[\text{Tr}] + [\text{Fe}] + 2[\text{Tr}_\text{o}] - [\text{Fe}_\text{o}]\}} \quad [10]$$

Vergelijking [9] kan ook aldus geschreven worden:

$$[\text{Tr}] = \frac{[\text{Fe}] + 2[\text{Tr}_\text{o}] - [\text{Fe}_\text{o}]}{K_1 \times [\text{Fe}] + 2} \quad [11]$$

Door deze uitdrukking voor  $[\text{Tr}]$  in te vullen in [10], krijgt men:

$$K_2 = \frac{\frac{[\text{Fe}] + 2[\text{Tr}_\text{o}] - [\text{Fe}_\text{o}]}{K_1 \times [\text{Fe}] + 2} - [\text{Fe}] - [\text{Tr}_\text{o}] + [\text{Fe}_\text{o}]}{[\text{Fe}] \{-2 \times \frac{[\text{Fe}] + 2[\text{Tr}_\text{o}] - [\text{Fe}_\text{o}]}{K_1 \times [\text{Fe}] + 2} + [\text{Fe}] + 2[\text{Tr}_\text{o}] - [\text{Fe}_\text{o}]\}} \quad [12]$$

Vervolgens kan [12] nog omgewerkt worden met het volgende resultaat:

$$\{[\text{Fe}]^3 + [\text{Fe}]^2 \times (2[\text{Tr}_\text{o}] - [\text{Fe}_\text{o}])\} \times K_2 + \frac{[\text{Fe}] - [\text{Fe}_\text{o}]}{K_1} =$$

$$= -[\text{Fe}]^2 + ([\text{Fe}_\text{o}] - [\text{Tr}_\text{o}]) \times [\text{Fe}] \quad [13]$$

In [13] zijn  $K_1$  en  $K_2$  uitgedrukt als functie van  $[\text{Fe}]$ ,  $[\text{Fe}]_\text{totaal}$  en  $[\text{Tr}]_\text{totaal}$  en daarmee in de gewenste experimenteel bepaalbare grootheden.

Door nu dialyse-experimenten uit te voeren met verschillende verhoudingen  $[\text{Tr}]_\text{totaal}$  en  $[\text{Fe}]_\text{totaal}$  kunnen een aantal gegevens betreffende de afhankelijkheid van  $[\text{Fe}]$ ,  $[\text{Fe}]_\text{totaal}$  en  $[\text{Tr}]_\text{totaal}$  worden verkregen, waarmee de  $K_1$  en  $K_2$  kunnen worden berekend. De rekenmethode waarmee dit is uitgevoerd, staat beschreven in hoofdstuk II. Als voordeel van de gebruikte dialyse-opzet kan worden genoemd, dat met een dergelijke proefopstelling de volumina van beide compartimenten zo gekozen kunnen worden, dat de ligging van de evenwichten [1] en [2] in het binnencompartiment kan worden beïnvloed. Dit leek van groot belang gezien het feit dat de uit de literatuur bekende K-waarden groot zijn. Het volume van de buitenvloeistof kan immers groot worden gekozen, zodat door de diffusie van Fe naar het buitencompartiment de transferrine-ijzer verbindingen in het binnencompartiment dissociëren. Verwacht werd, dat de bepaling van de ijzerconcentratie in de buitenvloeistof problemen zou opleveren. Op grond van de bekende hoge K-waarden werd verwacht, dat het ijzergehalte laag zou zijn. Aangenomen werd, dat dit ondervangen zou kunnen worden door deze oplossing met behulp van een indampprocedure te concentreren, wanneer de concentratie te laag zou zijn voor de ter beschikking staande analysemethoden.

Een tweede voordeel van de dialysemethode is dat, hoewel het transferrine-ijzer systeem in vitro wordt bestudeerd, het wenselijk lijkt zoveel mogelijk de fysiologische omstandigheden na te bootsen.

Een dialyse-opstelling vertoont enigermate gelijkenis met het twee compartimentensysteem, intravasculaire ruimte, interstitiële ruimte, zoals dit in het lichaam voorkomt. De verhouding qua volume tussen deze twee compartimenten in vivo bedraagt 1:5, hetgeen ook met een dialyseopstelling te bewerkstelligen is.

Opgemerkt moet worden, dat in navolging van Flexner, Vosburgh en Cowie<sup>65)</sup> wel wordt verondersteld, dat de capillairen voor transferrine vrij doorgankelijk zouden zijn. Indien dit juist zou zijn, vervalt uiteraard de parallel tussen de dialyse-opstelling en de toestand in vivo.

In het literatuuroverzicht werd melding gemaakt van het onderzoek verricht door Davis, Saltman en Benson<sup>56)</sup> in 1962 met dialyse-experimenten bij pH 7,4. Zoals reeds opgemerkt in deze inleiding zijn de waarden, die deze auteurs opgeven voor de beide evenwichtsconstanten zeer groot en wel  $10^{32}$  en  $10^{29}$  voor respectievelijk  $K_1$  en  $K_2$ . In de recente overzichtsartikelen van Bearn en Parker<sup>19c)</sup> en Feeney en Komatsu<sup>66)</sup> worden deze waarden nog steeds geciteerd. Wel worden de bedenkingen van Aasa en medewerkers<sup>43)</sup> tegen de resultaten van de experimenten van Davis en de zijnen aangehaald, maar zonder dat dit aanleiding geeft tot de vermelding van andere waarden. De waarden van de evenwichtsconstanten zoals hierboven aangehaald, geven aan, dat in de evenwichtstoestand vrijwel alle ijzer aan transferrine gebonden zal zijn. Zoals tevens uiteengezet werd in het literatuurgedeelte, is de proefopzet van Davis e.a. gecompliceerd. Deze auteurs stellen zich op het standpunt, dat ijzer als Fe (III) reageert met transferrine. Het probleem, dat deze vorm van het ijzer bij pH 7,4 vrijwel onoplosbaar is, omzeilen zij door toevoegen van EDTA. In de literatuurbesprekingen gingen wij in op de bezwaren, die aan deze voorstelling kleven.

Een tweede onderzoek met een dialyse-opstelling bij pH 7,4 betreffende de bepaling van de evenwichtsconstanten werd verricht door Aasa<sup>43)</sup>. Uit onze beschouwingen hierover blijkt dat de gegevens verkregen met dit onderzoek moeilijk interpreteerbaar zijn. Ook in dit onderzoek is EDTA gebruikt, teneinde met Fe (II) te kunnen werken, daar naast werden experimenten met citraat uitgevoerd.

De moeilijkheden die ondervonden werden bij het werken met Fe (III), brachten ons ertoe, na te gaan of niet een proefopzet met Fe (II) mogelijk was. Hierbij valt op te merken dat aangenomen wordt dat zowel Fe (II) als Fe (III) aanleiding geven tot het ontstaan van ijzer-transferrine complexen. Het reactiemechanisme is tot nu toe onbekend, zoals in hoofdstuk I uiteengezet werd. In het laatste hoofdstuk wordt op dit punt nader ingegaan.

## HET ONTWIKKELEN VAN EEN PROEFOPZET

In het voorgaande werd beschreven op welke wijze de evenwichtsconstanten berekend kunnen worden uit de grootheden, die met behulp van een dialyseopstelling meetbaar zijn, te weten  $[Fe]$ ,  $[Fe]_{\text{totaal}}$  en  $[Tr]_{\text{totaal}}$ . Voordat met behulp van een definitieve opstelling metingen konden worden

verricht, waarmee berekeningen konden worden gemaakt, moest de proefopzet worden ontwikkeld. In de literatuur was hiervoor geen aanknopingspunt aanwezig, daar wij met Fe (II) wilden werken.

De volgende omstandigheden werden gekozen. De buitenvloeistof had een volume van 500 ml. Als materiaal voor het dialysezakje werd een Viskingslang gekozen, die door dichtknopen van de beide uiteinden een volume kreeg van 20 ml. Als dialysebuffer werd een 0,05 molaire fosfaatoplossing gekozen met een pH van 7,4, waaraan was toegevoegd 4,5 gram NaCl per 500 ml, zodat een 0,155 molaire oplossing (= 0,9% oplossing) werd verkregen. Dezelfde buffer met identieke toevoeging werd ook als binnenvloeistof gebruikt.

Reeds bij de aanvang van het ontwikkelen van de proefopzet was het duidelijk, dat het waarschijnlijk onmogelijk zou zijn te werken met ijzer in de driewaardige ionvorm, aangezien het oplosbaarheidsproduct van ferrihydroxide  $4 \times 10^{-38}$  bedraagt bij  $25^{\circ} \text{C}$  <sup>67</sup>). Bij een pH gelijk aan 7,4 betekent dit, dat de ijzer (III) concentratie in oplossing gelijk is aan  $2 \times 10^{-18}$  mol/l, hetgeen niet bepaalbaar is.

Het leek gewenst dat het dialysezakje een hoeveelheid transferrine zou bevatten, die in de orde van grootte van de concentratie van humaan serum zou liggen; deze bedraagt 60  $\mu\text{mol/l}$  of 1,2  $\mu\text{mol}$  per 20 ml. Gekozen werd voor concentraties die varieerden tussen de 0,4 en 3  $\mu\text{mol}$  transferrine per 20 ml, dit komt overeen met 20-150  $\mu\text{mol/l}$ .

Wij kozen voor een hoeveelheid ijzer variërende van 5 tot 100  $\mu\text{mol}$  ijzer in de 500 ml buitenvloeistof, dit is dus 10 tot 200  $\mu\text{mol}$  ijzer/l. Zoals opgemerkt zou dit theoretisch niet mogelijk zijn wanneer de experimenten met ijzer (III) moeten worden uitgevoerd. Voor de goede orde werd dit nog even experimenteel gecontroleerd. De verwachtingen werden bewaarheid. In dialyse-experimenten die met een ijzer (III) zout werden uitgevoerd en waarvan de resultaten van een aantal experimenten zijn samengevat in tabel III-1 werd dit geconstateerd. De niet-weergegeven experimenten gaven soortgelijke resultaten.

Bij een dialysetijd van 24 uur bij kamertemperatuur was de hoeveelheid ijzer, die in het dialysezakje werd aangetroffen slechts een klein gedeelte van de te verwachten hoeveelheid op grond van de ijzerconcentratie in de buitenvloeistof. Getracht werd dit verschijnsel op te heffen door langer te dialyseren, doch dit leverde geen verbetering op. Werd aan de binnenvloeistof een aantal molen transferrine toegevoegd, dan bleek na 48 uur

Tabel III-1

## Experimenten met Fe (III)

dialysetijd in uren	transf.conc. in binnenopl. $\mu\text{mol/l}$	ijzerconc. in binnenopl. $\mu\text{mol/l}$	ijzerconc. in buitenopl. $\mu\text{mol/l}$
0	-	0	20,3
24	-	10,5	20,0
0	125	0	20,3
24	125	21,0	19,8

dialyseren de concentratie binnen wel sterker te zijn opgelopen; deze was ongeveer dezelfde geworden als in de buitenvloeistof. Echter een grotere concentratie werd verwacht op grond van berekeningen, waarbij de transferrine-ijzerbinding in aanmerking was genomen.

Onze gedachten gingen naar aanleiding van de te verwachten resultaten, uit naar een dialyse-opstelling, waarbij een ferro- in plaats van een ferri-zout werd gebruikt, aangezien de waarde van het oplosbaarheidsproduct van ferrohydroxide veel gunstiger ligt.

Dit bedraagt nl.  $2 \times 10^{-15}$  bij  $25^{\circ} \text{C}^{68}$ , hetgeen bij pH 7,4 neer komt op een ijzerconcentratie van  $3.3 \times 10^{-2} \text{ mol/l}$ , hetgeen ruim boven de te gebruiken ijzerconcentraties (10-200  $\mu\text{mol/l}$ ) ligt. Bij dialyseren met ferrosulfaat waren de resultaten echter vrijwel identiek aan die welke hierboven voor ijzer (III) zijn beschreven. Wij veronderstelden, dat dit een gevolg was van de omzetting Fe (II) in Fe (III). Inderdaad bleek het niet mogelijk te zijn in de oplossing voor 100% Fe (II) aan te tonen.

Wij zochten derhalve naar middelen om het ijzer in de tweewaardige vorm te houden. Daartoe werd aan de fosfaatbuffer ascorbinezuur toegevoegd in een concentratie van 3 mmol/l (= 0,5 g/l). De pH van de oplossing bleef ook na deze toevoeging 7.4. Ascorbinezuur werd gebruikt omdat deze stof als sterk reducerend middel bekend staat, en gebruikt wordt als reductans voor ijzer in de farmacie. Ook is het aanwezig in plasma. Bij de dialyse-experimenten met ferrosulfaat onder toevoeging van ascorbinezuur en goed afsluiten van het reactievat van de lucht was na 48 uur de concentratie binnen en buiten aan elkaar gelijk geworden. Tevens bleek het mogelijk te zijn met dit systeem transferrine op te laden, wanneer dit eiwit in het dialysezakje aanwezig was.

Dit is visueel reeds vast te stellen door de rode kleurontwikkeling van de binnenvloeistof.

Tabel III-2

## Experimenten met Fe (II)

dialysetijd in uren	transf.conc. in binnenopl. $\mu\text{mol/l}$	ijzerconc. in binnenopl. $\mu\text{mol/l}$	ijzerconc. in buitenopl. $\mu\text{mol/l}$
0	-	0	20,0
24	-	15,3	19,7
48	-	17,5	19,3
0	125	-	20,0
24	125	18,4	19,2
48	125	39,4	18,4
* 0	-	0	20,1
24	-	-	19,5
48	-	19,3	19,4
72	-	19,4	19,4
* 0	125	0	20,0
24	125	-	19,6
48	125	73	17,0
72	125	89	16,8

\* Bij de laatste twee experimenten was ascorbinezuur toegevoegd, 3 mmol/l.

De resultaten van enkele experimenten, die op de bovenstaande manier met Fe (II) werden verricht zijn in tabel III-2 samengevoegd. Herhaling van deze experimenten gaf steeds dezelfde resultaten.

Als aanvulling op de beschreven experimenten met Fe (III) en Fe (II) kan nog het volgende worden opgemerkt:

1. Een identiek beeld als in de tabellen III-1 en III-2 weergegeven, werd gevonden wanneer gedialyseerd werd met andere ijzer- en transferrine-concentraties dan de genoemde. Deze bedroegen respectievelijk 10-100  $\mu\text{mol/l}$  en 50-100  $\mu\text{mol/l}$ .
2. Aan het einde van de diverse dialyse-experimenten waarbij ijzer (II) en ascorbinezuur werden gebruikt, werd de buitenvloeistof onderzocht op de valentietoestand van het ijzer. Hiertoe werd aan een monster van de buitenvloeistof  $\alpha, \alpha'$ -dipyridyl in water (6 mmol/l) toegevoegd. Aan een ander monster van dezelfde vloeistof werd een extra hoeveelheid ascorbinezuur toegevoegd en hierna hetzelfde kleurreagens. Bij meting van de extinctie bij 510 nm bleek het verschil verkregen na deze twee procedures miniem te zijn. De conclusie lijkt gewettigd dat het ijzer in de gewenste Fe (II) toestand is gebleven.
3. Gecontroleerd werd of een eiwit dat niet specifiek ijzer bindt, invloed



had op de ligging van het evenwicht. In het dialyse-zakje werd daartoe een gezuiverd Bence Jones eiwit gebracht tot eenzelfde concentratie als transferrine. Er bleek geen invloed te constateren op de verdeling van ijzer in beide compartimenten.

Op grond van onze experimenten kwamen wij tot de volgende, schematisch weergegeven, opstelling (figuur III-1).

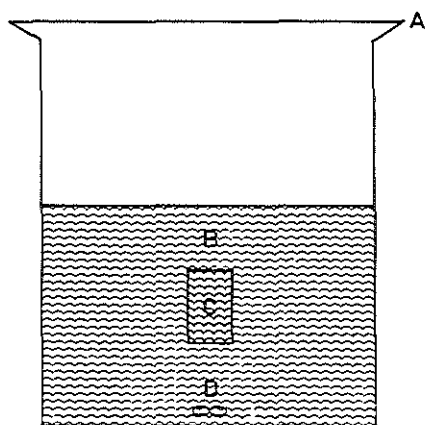


Fig. III-1. Schematische weergave van de gebruikte dialyse-opstelling, waarbij als reductans ascorbinezuur of natriumsulfiet wordt gebruikt.

A = parafilm en aluminiumfolie ter afsluiting van het reactievat.

B = buitenvloeistof (500 ml of 110 ml)

C = binnenvloeistof

D = roer-element.

Met het hierboven beschreven systeem werd nagegaan hoe lang de dialyse-tijd minimaal moet zijn om de evenwichtstoestand te bereiken. Bij het bepalen van deze tijd werd in eerste instantie alleen het ijzer in de buitenvloeistof bepaald. Bekeken werd de afname van dit ijzergehalte wanneer in het dialysezakje transferrine met buffer of alleen buffer aanwezig was; dit laatste wordt aangegeven met de term "blanco". Bij het experiment, waarbij in het zakje een hoeveelheid transferrine werd gebracht, zodat de concentratie  $125 \mu\text{mol/l}$  werd en waarbij in de buitenvloeistof ijzer aanwezig was met een gehalte van  $20 \mu\text{mol/l}$ , was een beeld te zien zoals weergegeven in figuur III-2. In deze figuur is ook de afname van het ijzer in de buitenvloeistof te zien bij het blanco-experiment. Hierbij valt op, dat bij de blanco

het evenwicht bereikt is na 20-28 uur en dat bij het experiment met transferrine deze tijd tussen de 60 en 72 uur ligt.

Dergelijke experimenten ter bepaling van de dialysetijd werden ook uitgevoerd met andere ijzer- en transferrine-concentraties, waarbij hetzelfde resultaat werd verkregen.

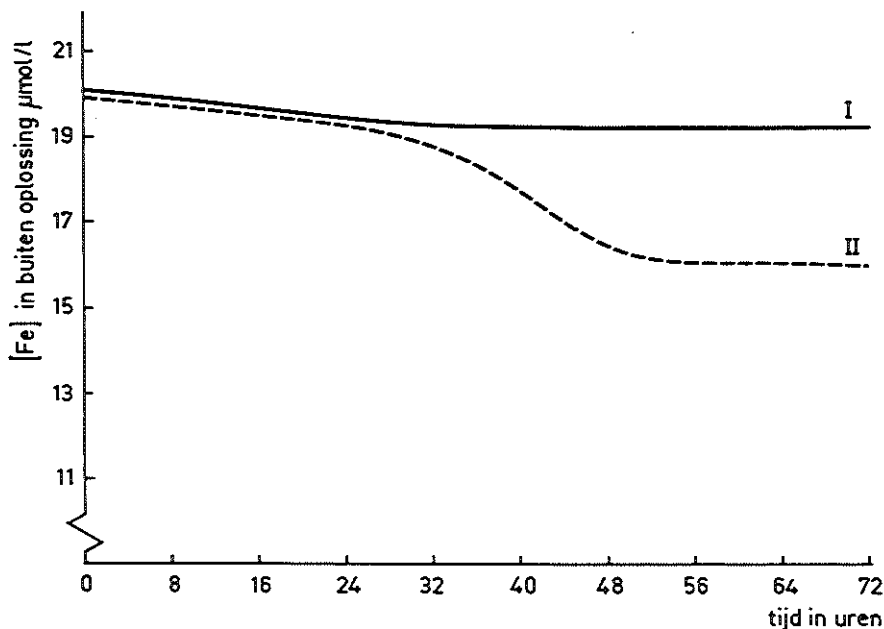


Fig. III-2. Invloed van de tijd op de dialyse-experimenten met ascorbinezuur. IJzer in buitenvloeistof bepaald. Curve I: Geen transferrine in binnenvloeistof, Curve II: Transferrine in binnenvloeistof (125  $\mu\text{mol/l}$ ).

Bij beide experimenten op  $t = 0$  in buitenvloeistof aanwezig: 20  $\mu\text{mol/l}$  aan ijzer (II).

Aangetekend moet worden, dat het bepalen van het ijzergehalte alleen in de buitenvloeistof een relatief grotere fout met zich mede brengt, dan wanneer op verschillende tijden de ijzerconcentratie van de binnenvloeistof ook bepaald wordt.

In figuur III-3 zijn ter illustratie ook de resultaten weergegeven van een experiment, waarbij zowel in de binnen- als in de buitenvloeistof het verloop van de ijzerconcentratie in de tijd is nagegaan. Ook verderop in dit hoofdstuk is nog een dergelijk experiment weergegeven. Op grond van de verkregen resultaten werd een dialysetijd van 64-72 uur gekozen.

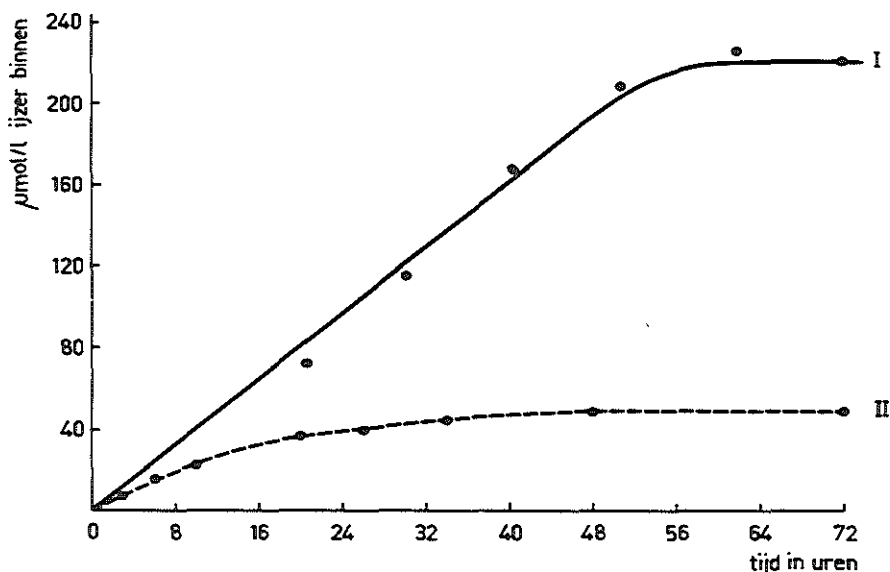


Fig. III-3. Invloed van de tijd op de dialyse-experimenten met ascorbinezuur. Ijzer in binnenvloeistof bepaald. Curve I: Geen transferrine in binnenvloeistof. Curve II: Transferrine in binnenvloeistof (125  $\mu\text{mol/l}$ ).

Bij beide experimenten op tijdstip  $t = 0$  in buitenvloeistof aanwezig: 50  $\mu\text{mol/l}$  ijzer (II).

#### DIALYSE-EXPERIMENTEN WAARBIJ ASCORBINEZUUR WERD TOEGEVOEGD

Met de verkregen proefopzet werden een aantal experimenten verricht teneinde voldoende gegevens te verkrijgen voor een redelijk nauwkeurige berekening van  $K_1$  en  $K_2$ . Een eerste reeks werd op de volgende wijze uitgevoerd:

Met een bepaalde hoeveelheid transferrine in het dialysezakje werd een reeks proeven verricht, waarbij in de buitenvloeistof opklimmende hoeveelheden van een ijzer (II) zout waren gevoegd. Na een dialysetijd van 72 uur werden resp. bepaald:

1. De concentratie van ijzer in de buitenvloeistof.
2. De concentratie van ijzer in de binnenvloeistof.
3. De concentratie van transferrine in de binnenvloeistof.
4. De volumina van de binnen- en buitenvloeistoffen.

Als gebonden ijzer werd beschouwd de totale hoeveelheid ijzer in het binnencompartiment verminderd met de hoeveelheid ijzer die in het buitencompartiment werd bepaald.

Bepaling van 3) gaf de ijzerhoeveelheid aan, die maximaal gebonden kon

worden, ervan uitgaande dat 1 mol transferrine maximaal 2 mol ijzer kan binden. Op deze wijze kon voor iedere hoeveelheid ijzer toegevoegd aan de buitenvloeistof het verzadigingspercentage van het transferrine bepaald worden. Ter controle werd bij een dergelijke serie experimenten ook de "blanco" serie uitgevoerd. Bij deze serie waren de ijzertoevoegingen dezelfde als die bij de experimenten met transferrine.

Als voorbeeld van een dergelijke serie geldt het volgende experiment:

Binnenvloeistof	Buitenvloeistof
20 ml	500 ml
0,05 molair fosfaat pH = 7,4	0,05 molair fosfaat pH = 7,4
NaCl (0,155 mol/l)	NaCl (0,155 mol/l)
Ascorbinezuur (3 mmol/l)	Ascorbinezuur (3 mmol/l)
bij de blanco exp. geen transf.	Als ijzer werd resp. toegevoegd
bij de andere exp.	10, 25, 50, 75, 100 en 125
2 $\mu\text{mol}$ apotransf./20 ml.	$\mu\text{mol Fe}^{2+}$ per 500 ml.

Dialysetijd 72 uur.

De resultaten van dit experiment zijn grafisch weergegeven in figuur III-4.

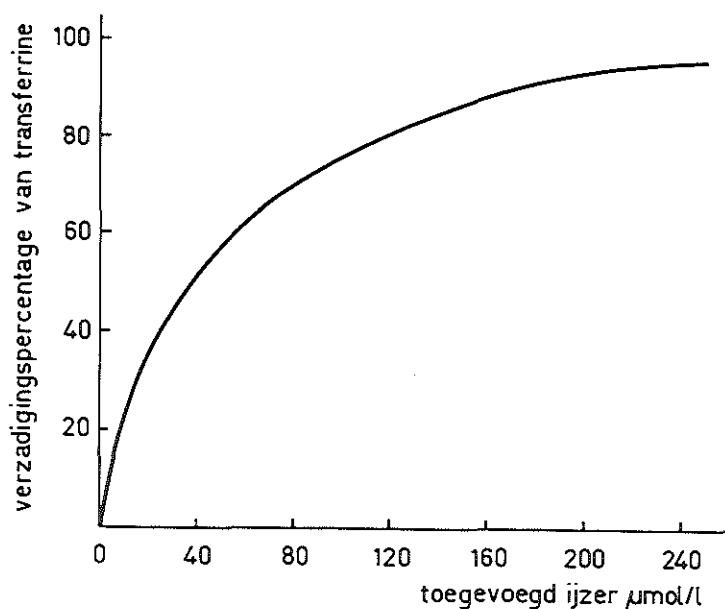


Fig. III-4. Verzadigingscurve van transferrine bij toevoeging van ijzer aan de buitenvloeistof. Transferrine-concentratie 100  $\mu\text{mol/l}$ . Volume buitenvloeistof 500 ml. Volume binnenvloeistof 20 ml.

Bij experimenten met andere transferrine- en ijzerconcentraties werd eenzelfde beeld verkregen voor het verzadigingspercentage.

Deze gegevens leverden ons een aanwijzing, dat de evenwichtsconstanten  $K_1$  en  $K_2$  niet de waarden  $10^{+32}$  en  $10^{+29}$  konden hebben. Wanneer dit wel het geval zou zijn, dan zou de maximale verzadiging van het transferrine reeds bij een veel lagere ijzerconcentratie bereikt moeten worden. Uit de grafiek, verkregen door de hoeveelheid ijzer, die bij afwezigheid van transferrine in het dialysezakje gevonden werd uit te zetten tegen de totale hoeveelheid toegevoegd ijzer, leidden wij af, dat het ijzer ongehinderd het membraan kon passeren. Dit is voor de proefopstelling van vitaal belang. Bij alle dialyse-experimenten werd dit soort blanco's uitgevoerd ter controle van de gang van zaken.

Bij enkele series experimenten werd ook het radioactieve ijzer-59 isotoop gebruikt, teneinde na te gaan of de specifieke activiteiten in de binnen- en buitenvloeistof gelijk aan elkaar waren na dialyseren. Een voorbeeld hiervan is weergegeven in tabel III-3.

Tabel III-3

Een serie experimenten met transferrine en ijzer, aan de buitenoplossing is 2  $\mu$ Ci Fe-59 toegevoegd.

dialysetijd in uren	transf. conc. in $\mu$ mol/l	ijzerconc. in binnen opl. $\mu$ mol/l	ijzerconc. in buiten opl. $\mu$ mol/l	tot. act. binnen counts/ 100"/ $\mu$ mol/l $\times 10^5$	tot. act. buiten counts/ 100"/ $\mu$ mol/l $\times 10^5$	s. a. binnen C/100"/ $\mu$ mol/l $\times 10^5$	s. a. buiten C/100"/ $\mu$ mol/l $\times 10^5$
0	-	0	20,0	0	14,6	0	0,74
64	-	19,5	19,4	14,0	14,0	0,72	0,72
0	32,5	0	20,0	0	14,6	0	0,74
64	32,5	53,0	17,5	59,0	12,2	0,90	0,72
0	-	0	32,2	0	14,8	0	0,46
64	-	30,6	30,5	14,0	14,0	0,47	0,46
0	32,5	0	32,2	0	14,8	0	0,46
64	32,5	72,5	29,2	35,0	13,4	0,48	0,46
0	-	0	47,2	0	14,6	0	0,31
64	-	45,2	45,4	14,5	14,0	0,32	0,31
0	32,5	0	47,2	0	14,6	0	0,31
64	32,5	95,5	43,6	27,0	13,6	0,29	0,31
0	-	0	63,6	0	14,4	0	0,23
64	-	61,0	61,2	14,0	13,8	0,23	0,22
0	32,5	0	63,6	0	14,4	0	0,23
64	32,5	115,0	59,0	22,0	13,6	0,19	0,22
0	-	0	80,0	0	14,6	0	0,18
64	-	77,0	76,8	14,0	14,0	0,18	0,18
0	32,5	0	80,0	0	14,6	0	0,18
64	32,5	132,0	74,6	22,0	13,6	0,17	0,18

Zoals uit tabel III-3 blijkt, zijn de respectievelijke specifieke activiteiten aan elkaar gelijk.

De resultaten, verkregen uit dergelijke experimenten, verleenden een grote steun aan de opvatting, dat de proefopzet geschikt is om de evenwichtsconstanten  $K_1$  en  $K_2$  te bepalen.

In andere series experimenten werden de begintoestanden verschillend gekozen, op grond van de verkregen waarden. De indeling van deze experimenten was:

- a. Experimenten waarbij uitgegaan werd van een verzadigde transferrine-oplossing in het dialysezakje en een ijzervrije buitenvloeistof.
- b. Experimenten waarbij verzadigd transferrine in het dialysezakje aanwezig was en een hoeveelheid ijzer in de buitenvloeistof. Tevens werd aan één van beide compartimenten het ijzer-59 isotoop toegevoegd, zodat de uitwisseling van het ijzer-56 en ijzer-59 bestudeerd kon worden.
- c. Experimenten waarbij humaan serum gebruikt werd inplaats van een transferrine-oplossing als binnenvloeistof. Van dit serum was de concentratie van transferrine bekend, zodat dit serum vergeleken kon worden met een transferrine-oplossing.

ad a) Uit de dialyse-experimenten, waarbij transferrine opgeladen werd vanuit de buitenvloeistof bleek, dat er sprake was van een onverwacht grote  $[Fe]$ . Het leek daarom aangewezen de proefopstelling te gebruiken om na te gaan hoeveel ijzer zich zou afsplitsen tijdens het dialyseren, wanneer uitgegaan werd van verzadigd transferrine in het dialysezakje. Als transferrine-concentraties in het dialysezakje werden soortgelijke concentraties als bij de andere experimenten gebruikt. Dit hield in, dat de te verwachten concentratie aan ijzer in de buitenvloeistof gering was. Besloten werd daarom over te gaan op een buitenvolume van 110 ml in plaats van 500 ml, teneinde de ijzerconcentraties binnen bepalingsbereik te houden. Aan de oplossing van transferrine met bekende concentratie werd voor de dialyse een hoeveelheid ijzer toegevoegd, die molair tweemaal zo groot was als het eiwit. Deze oplossing werd in het dialysezakje gedaan, dat in de buitenvloeistof werd geplaatst. Steeds werden blanco experimenten uitgevoerd, waarbij aan de binnenvloeistof eenzelfde hoeveelheid ijzer was toegevoegd als bij de boven beschreven experimenten met transferrine. De uitkomsten van een aantal experimenten als bedoeld onder a, staan als voorbeeld vermeld in tabel III-4.

Tabel III-4

Experimenten waarbij uitgegaan werd van verzadigd transferrine in het dialysezakje en een ijzervrije buitenoplossing (volume 110 ml).

dialysetijd in uren	transf. conc. $\mu\text{mol/l}$	ijzerconc. in binnenopl. $\mu\text{mol/l}$	ijzerconc. in buitenopl. $\mu\text{mol/l}$
0	-	50,0	-
64	-	7,0	7,5
0	25,0	49,1	-
64	25,0	34,0	2,7
0	-	100,0	-
64	-	15,5	15,4
0	50,0	99,0	-
64	50,0	69,0	5,5
0	-	198,0	-
64	-	32,0	31,4
0	100,0	198,0	-
64	100,0	137,5	11,5

Uit tabel III-4 blijkt, dat met behulp van dialyseren een meetbare hoeveelheid ijzer zich afsplitst van het transferrine-ijzer complex, hetgeen de eerste indruk, dat de K-waarden niet zeer groot kunnen zijn, ondersteunt. Vanwege de geringe ijzerconcentraties in de buitenvloeistof was het niet mogelijk bij deze proefopstelling de afhankelijkheid van de tijd te bepalen zoals dit is beschreven voor de proefopstelling waarbij op tijdstip 0 slechts de buitenvloeistof ijzer bevat.

ad b) Het leek wenselijk na te gaan of in de evenwichtstoestand sprake was van een dynamisch evenwicht. Het twee compartimentensysteem is ingewikkeld en bevat onbekende factoren, zoals diffusiesnelheid en de snelheid van passeren van de membraan. Maar het leek in ieder geval mogelijk een kwalitatief inzicht te verkrijgen in het systeem. Deze bestudering geschiedde met behulp van het radio-actieve ijzer-59 isotoop. Hierbij werd nagegaan of Fe-59 zich in de evenwichtstoestand van buiten naar binnen en in omgekeerde richting begeeft. In het dialysezakje werd de verzadigde transferrineoplossing gebracht en een dusdanige hoeveelheid ijzer, dat er van 100% oververzadiging sprake was. Bij de blanco-experimenten was er geen transferrine in de binnenvloeistof aanwezig. De hoeveelheid ijzer was dezelfde als bij de transferrine-experimenten. In de buitenvloeistof was een zodanige hoeveelheid ijzer aanwezig, dat het transferrine verzadigd bleef. Deze hoeveelheden

waren berekend uit de series experimenten, die uitgevoerd waren teneinde de verzadigingscurves te bepalen. Het radioactieve ijzer-59 isotoop werd op verschillende manieren toegevoegd, nl.:

1. Tijdens het verzadigen van transferrine tezamen met het ijzer-56 en bij de blanco' aan het ijzer-56 dat in de dialysehuls werd gebracht. In dit geval was in de buitenvloeistof geen ijzer-59 aanwezig.
2. Aan de buitenvloeistof, terwijl aan de binnenvloeistof geen ijzer-59 toegevoegd werd. De werkwijzen 1) en 2) werden toegepast bij verschillende ijzer- en transferrine-concentraties en bij diverse volumina teneinde de invloed van de concentraties na te gaan. De uitkomsten van enkele van de experimenten bedoeld onder b zijn vermeld in tabel III-5.

Tabel III-5

Enkele uitwisselingsexperimenten met Fe-59.

dialysetijd in uren	transf. conc. $\mu\text{mol/l}$	ijzerconc. in binnen- opl. $\mu\text{mol/l}$	s. a. binnen C/100"/ $\mu\text{mol/l}$ $\times 10^5$	ijzerconc. in buiten opl. $\mu\text{mol/l}$	s. a. buiten C/100"/ $\mu\text{mol/l}$ $\times 10^5$	plaats van de activ. op $t = 0$ uur
0	-	62,0	20,10	63,6	-	In binnenopl.
72	-	62,0	0,79	64,2	0,75	
0	31,2	126,0	9,90	63,6	-	In binnenopl.
72	33,2	126,0	1,59	64,2	0,63	
0	-	62,0	-	63,6	0,78	In buitenopl.
72	-	62,0	0,74	63,6	0,73	
0	31,2	126,0	-	65,4	0,76	In buitenopl.
72	31,2	127,0	0,87	65,0	0,70	
0	-	126,0	87,50	12,6	-	In binnenopl.
72	-	126,0	3,42	12,6	3,44	
0	62,5	24,9	44,30	12,4	-	In binnenopl.
72	62,5	24,9	7,80	12,4	2,78	
0	-	12,6	-	12,6	3,50	In buitenopl.
72	-	12,6	3,42	12,6	3,42	
0	62,5	249,0	-	12,4	3,54	In buitenopl.
72	62,5	249,0	4,22	12,4	3,06	
0	50,0	196,5	2,83	100,4	-	In binnenopl.
72	50,0	197,0	0,40	100,4	0,28	
0	50,0	196,5	-	100,4	0,58	In buitenopl.
72	50,0	197,5	0,20	100,4	0,56	
0	50,0	197,0	2,80	22,6	-	In binnenopl.
72	50,0	198,0	0,70	22,6	0,80	
0	50,0	198,0	-	22,6	0,60	In buitenopl.
72	50,0	196,5	0,35	22,6	0,50	



De conclusies uit deze experimenten zijn de volgende:

Bij de experimenten, waarbij geen transferrine aanwezig is, verdeelt Fe-59 zich, gezien de specifieke activiteiten, homogeen over de beide compartimenten. Het feit dat de specifieke activiteiten in binnen- en buitenvloeistof niet gelijk aan elkaar zijn, wanneer transferrine aanwezig is, moet waarschijnlijk een gevolg zijn van het feit, dat deze experimenten te kort geduurd hebben om een gelijkmatige verdeling van Fe-59 te bewerkstelligen. Zoals reeds gesteld, is het twee compartimentensysteem ingewikkeld, zodat een preciese evaluatie van de verkregen gegevens moeilijk is.

Op een en ander zal in de discussie worden teruggekomen. In ieder geval blijkt uit de gegevens, dat Fe-59 zich tot op grote hoogte uniform over beide compartimenten verdeelt en dat de proefopzet voor de berekening van  $K_1$  en  $K_2$  aan de eisen voldoet.

ad c) Het doel van deze experimenten was na te gaan of het handelstranferrine dat in onze proefopzet gebruikt wordt, dezelfde eigenschappen vertoont als transferrine in humanserum. Daartoe werden experimenten uitgevoerd, waarbij zowel handelstranferrine als transferrine uit serum, dat ijzervrij gemaakt was volgens de methode beschreven in hoofdstuk II, werd opgeladen vanuit de buitenoplossing. Voorts werden ook uitwisselingsexperimenten met het humanserum uitgevoerd, zoals onder b voor transferrine werd beschreven. Daartoe is het uiteraard nodig dat van het ijzervrij opgevangen serum het transferrinegehalte bepaald wordt.

Er is ook een serie uitwisselingsexperimenten uitgevoerd met Fe-59, waarbij niet gedialyseerd serum werd gebruikt.

De resultaten van de diverse experimenten staan vermeld in de tabellen III-6 en III-7.

Tabel III-6

Experimenten met gedialyseerd serum en handelstranferrine (waarbij ijzer op  $t = 0$  uur in de buitenvloeistof aanwezig was).

dialysetijd in uren	transf. conc. $\mu\text{mol/l}$	ijzerconc. in binnenopl. $\mu\text{mol/l}$	ijzerconc. in buitenopl. $\mu\text{mol/l}$
0	20,0	-	20,4
72	20,0	50,2	17,6
0	20,0	-	40,8
72	20,0	80,5	37,8
0	20,0	-	60,4
72	20,0	97,0	56,6
0	20,0	-	20,4
* 72	20,0	50,3	17,8
0	20,0	-	40,8
* 72	20,0	72,5	37,6
0	20,0	-	60,4
* 72	20,0	83,0	57,2

\* Experimenten met handelstranferrine.

Tabel III-7

Uitwisselingsexperimenten met serum.

dialysetijd in uren	transf. conc. $\mu\text{mol/l}$	ijzerconc. in binnen opl. $\mu\text{mol/l}$	s.a. binnen opl. C/100" / $\mu\text{mol/l} \times 10^5$	ijzerconc. in buiten opl. $\mu\text{mol/l}$	s.a. buiten opl. C/100" / $\mu\text{mol/l} \times 10^5$	plaats van activ. op $t = 0$ uur	bijzonderh.
0	25	110,4	10,60	52,8	-	In binnenopl.	gedial. serum
72	25	100,4	2,30	52,8	0,68		
0	25	100,4	-	52,8	0,83	In buitenopl.	idem
72	25	100,4	0,77	52,8	0,79		
0	75	148,5	4,22	75,8	-	In binnenopl.	niet ge-dial. serum
72	75	148,5	0,51	75,8	0,31		
0	75	149,5	-	75,8	0,33	In buitenopl.	idem
72	75	148,5	0,40	75,8	0,30		

# BEREKENING VAN DE EVENWICHTSCONSTANTEN VAN HET TRANSFERRINE-IJZERSYSTEEM MET BEHULP VAN DE BESCHREVEN PROEFOPSTELLING

In het hierboven vermelde experimentele gedeelte werd beschreven welke omstandigheden gekozen werden. Hierbij werden per serie enkele voorbeelden gegeven. In de hierna volgende tabellen III-8 en III-9 staan de resultaten vermeld van de experimenten, die voor de berekening gebruikt zullen worden.

Tabel III-8

Dialyse experimenten waarmee de dissociatie-constanten berekend zijn.

buitenopl. in ml	binnenopl. in ml	transf. conc. in μmol/	ijzerconc. binnenopl. μmol/l	ijzerconc. buitenopl. μmol/l	verzadigings- graad (%)
500	20	125	55,5	9,2	18
500	20	125	81,0	18,4	25
500	20	125	95,5	15,8	31
500	20	125	305,5	88,0	87
500	20	125	330,5	110,4	88
500	20	125	415,0	182,0	94
500	20	125	476,0	232,0	98
500	20	31	28,5	9,0	31
500	20	31	50,5	14,2	58
500	20	31	80,0	29,6	81
500	20	31	102,0	44,2	93
500	20	31	53,5	29,6	55
500	20	31	77,5	28,8	78
500	20	31	155,0	92,0	100
500	20	125	440,0	254,0	75
500	20	125	420,0	258,0	65
500	20	31	127,0	64,6	98
500	20	75	149,0	75,8	49
500	20	50	204,5	101,4	100
500	20	25	72,5	37,8	70
500	20	25	93,0	47,2	92
500	20	20	18,5	0,9	44

Bij de berekening van de K-waarden werd, zoals reeds aangegeven op pagina 46 gebruik gemaakt van formule [13], die hier nogmaals wordt weergegeven.

$$\{[\text{Fe}]^3 + [\text{Fe}]^2 \times (2[\text{Tr}_\text{o}] - [\text{Fe}_\text{o}])\} \times K_2 + \frac{[\text{Fe}] - [\text{Fe}_\text{o}]}{K_1} =$$

$$- [\text{Fe}]^2 + [\text{Fe}] ([\text{Fe}_\text{o}] - [\text{Tr}_\text{o}]) \quad [13]$$

Tabel III-9

Als tabel III-8

buitenopl.	binnenopl.	transf. conc.	ijzerconc.	ijzerconc.	verzadigings-
in ml	in ml	in $\mu\text{mol/l}$	binnenopl. $\mu\text{mol/l}$	buitenopl. $\mu\text{mol/l}$	graad (%)
110	20	50	64,0	7,1	57
110	20	25	31,5	3,5	56
110	20	75	89,5	10,7	52
110	20	100	123,0	11,7	56
110	20	125	160,0	15,8	58
110	20	50	77,0	4,1	72
110	20	100	150,8	8,3	71
110	20	23	34,0	2,9	61
110	20	50	30,5	3,6	27
110	20	50	44,5	5,3	39
110	20	50	60,0	7,3	52
110	20	50	77,0	8,7	68
110	20	50	93,0	10,8	82
110	20	100	70,5	8,8	32
110	20	100	81,0	11,0	35
110	20	100	99,0	12,7	43
110	20	100	104,0	14,5	45
110	20	100	135,5	18,5	59
110	20	100	78,5	9,1	34
110	20	100	90,0	11,2	39
110	20	100	113,5	13,3	50
110	20	100	117,0	15,2	51
110	20	100	146,5	18,5	64
110	20	100	174,0	22,6	76
110	20	100	14,5	1,9	6
110	20	100	32,0	3,6	14
110	20	100	48,5	5,3	22
110	20	100	63,5	7,0	28
110	20	150	19,5	1,3	6
110	20	150	38,5	2,3	12
110	20	150	55,5	3,8	17
110	20	150	76,0	5,0	24

De waarden van  $[\text{Fe}]$ ,  $[\text{Fe}_0]$  en  $[\text{Tr}_0]$ , dus respectievelijk de concentraties van het niet-gebonden ijzer, van het totale ijzer en van het totale transferine, werden in deze vergelijking gesubstitueerd. Door twee experimenten te combineren konden  $K_1$  en  $K_2$  worden uitgerekend. aangezien voor deze twee onbekenden op deze wijze twee lineaire vergelijkingen bestonden. Er werden 55 combinaties van twee experimenten gemaakt en daaruit de evenwichtsconstanten berekend. Deze berekeningen werden uitgevoerd met behulp van een computerprogramma dat in hoofdstuk II werd beschreven.

Uit deze berekeningen werden voor de evenwichtsconstanten de volgende waarden verkregen:

$K_1 = 0,25 \times 10^6$  met een standaardafwijking van het gemiddelde van  $0,15 \times 10^6$ .

$K_2 = 0,5 \times 10^5$  met een standaardafwijking van het gemiddelde van  $0,3 \times 10^5$ .

De grootte van de standaardafwijking is een gevolg van meerdere oorzaken. Zoals in het hoofdstuk "methoden" is beschreven zijn de standaardafwijkingen bij de transferrinebepaling 5%, bij de ijzerbepaling 5% en bij de bepaling van diverse volumina 4%. In de discussie wordt hierop nader ingegaan.

#### ENKELE AANVULLENDE PROEVEN BETREFFENDE DE INVLOED VAN DE TEMPERATUUR EN HET BICARBONAATGEHALTE

Zoals werd gezegd, werden de dialyse-experimenten uitgevoerd bij  $20^\circ \text{C}$ . Het leek nuttig de invloed van de temperatuur op het systeem nog nader te bekijken. Daartoe werden dialyse-experimenten, waarbij constante ijzer- en transferrine-concentraties werden gebruikt, uitgevoerd bij diverse temperaturen gedurende eenzelfde dialysetijd.

Hierbij werd verzadigd transferrine in het dialyse-zakje gebracht en gedialyseerd tegen 110 ml buitenvloeistof. Een voorbeeld van een dergelijke reeks staat vermeld in tabel III-10. Zoals deze resultaten tonen, is er nauwelijks verschil te constateren tussen de resultaten van de experimenten uitgevoerd in het temperatuurbereik van 20 tot  $40^\circ \text{C}$ .

Tabel III-10

Invloed van de temperatuur.

dialysetijd in uren	temp. in $^\circ \text{C}$ .	transf. conc. in $\mu\text{mol/l}$	ijzerconc. in binnen- opl. in $\mu\text{mol/l}$	ijzerconc. in buiten- opl. in $\mu\text{mol/l}$
0	4	50	99,0	-
64	4	50	83,5	2,6
0	10	50	99,0	-
64	10	50	78,5	3,5
0	20	50	99,0	-
64	20	50	69,0	5,5
0	30	50	99,0	-
64	30	50	69,5	5,5
0	40	50	99,0	-
64	40	50	72,0	5,2

Ook werd de invloed van bicarbonaat op de dialyse-experimenten bekeken. In het literatuuroverzicht werd vermeld, dat er een verschil van opvatting bestaat tussen enkele auteurs<sup>40, 43, 10)</sup> over de rol van het  $\text{HCO}_3^-$  anion bij het tot stand komen van de ijzertransferrine binding. De dialyse-experimenten, die in het voorgaande besproken werden, waren uitgevoerd in een milieu waarbij geen extra  $\text{HCO}_3^-$  was toegevoegd. Dit wil echter niet zeggen, dat bij experimenten uitgevoerd met ascorbinezuur, de oplossingen vrij waren van dit anion, aangezien berekend kan worden dat er altijd  $\text{CO}_2$  uit de lucht wordt opgenomen. Hiervoor geldt de volgende relatie (58):

$$K = \frac{[\text{HCO}_3^-][\text{H}^+]}{Q \times p\text{CO}_2}$$

hierin is  $Q$  de oplosbaarheidsconstante,  $p\text{CO}_2$  de partiële druk van  $\text{CO}_2$  in de lucht en  $K$  een constante.

Tabel III-11

Experimenten met en zonder extra bicarbonaat toevoeging.

dialysetijd in uren	transf. conc. $\mu\text{mol/l}$	experimenten met $\text{HCO}_3^-$ - toevoeging (25 mmol/l)		experimenten zonder $\text{HCO}_3^-$ toevoeging	
		ijzerconc. in binnenopl. $\mu\text{mol/l}$	ijzerconc. in buitenopl. $\mu\text{mol/l}$	ijzerconc. in binnenopl. $\mu\text{mol/l}$	ijzerconc. in buitenopl. $\mu\text{mol/l}$
0	50	50,1	-	50,0	-
72	50	30,5	3,65	29,5	3,90
0	50	75,5	-	75,0	-
72	50	44,5	5,35	44,5	5,50
0	50	101,0	-	100,0	-
72	50	60,0	7,25	59,0	7,40
0	50	126,0	-	128,0	-
72	50	77,0	8,80	79,0	8,95
0	50	150,0	-	150,0	-
72	50	93,0	10,60	90,5	10,80
0	50	-	45,50	-	46,50
68	50	100,9	25,70	100,7	26,80
0	50	-	9,30	-	9,40
68	50	32,0	3,50	29,0	4,40
0	20	-	20,40	-	20,40
72	20	50,2	17,60	50,4	17,80

Onder onze proefomstandigheden geldt:

$$pK = 6,148 \quad pCO_2 = 0,04 \times 10^{-2} \text{ atm.}$$

$$pH = 7,4 \quad Q = 0,0383$$

Ingevuld in bovenstaande relatie wordt  $[HCO_3^-] = 0,3 \text{ mmol/l.}$

Toch werd getracht een indruk te verkrijgen van de invloed van het bicarbonaat op het evenwicht door een extra hoeveelheid aan de oplossingen toe te voegen. Gekozen werd voor een concentratie van 25 mmol/l.

In de tabellen III-11 en III-12 staan de resultaten van experimenten vermeld, waarin een vergelijking wordt gemaakt tussen proeven met en "zonder" bicarbonaat, onder overigens gelijke omstandigheden.

Tabel III-12

Uitwisselingsexperimenten met Fe-59 met en zonder  $HCO_3^-$ -toevoeging.

dialysetijd in uren	transf.conc. $\mu\text{mol/l}$	ijzerconc. in binnen opl. $\mu\text{mol/l}$	ijzerconc. in buiten opl. $\mu\text{mol/l}$	s. a. in binnen- opl. C/100"/ $\mu\text{mol/l}$ $\times 10^5$	s. a. in buiten- opl. C/100"/ $\mu\text{mol/l}$ $\times 10^5$	$HCO_3^-$ -toevoe- gingen 25 mmol/l
0	50	204,0	102,0	3,0	-	geen $HCO_3^-$
72	50	206,0	100,2	0,5	0,2	toev.
0	50	204,0	101,0	3,0	-	+ $HCO_3^-$
72	50	206,0	100,6	0,5	0,2	toev.
0	50	204,5	101,0	0,3	0,3	+ $HCO_3^-$
72	50	204,0	100,6	0,3	0,2	toev.
0	50	204,0	101,8	-	0,2	geen $HCO_3^-$
72	50	204,0	101,0	0,3	0,2	toev.
0	50	197,5	100,4	2,8	-	geen $HCO_3^-$
72	50	197,0	100,4	0,4	0,2	toev.
0	50	197,5	100,4	2,8	-	+ $HCO_3^-$
72	50	197,5	100,4	0,4	0,2	toev.
0	50	196,5	100,4	-	0,6	geen $HCO_3^-$
72	50	197,5	100,4	0,2	0,6	toev.
0	50	197,5	100,4	-	0,6	+ $HCO_3^-$
72	50	197,5	100,4	0,2	0,6	toev.

In tabel III-11 zijn de resultaten weergegeven van de experimenten waarbij gedialyseerd werd met een binnenvolume van 20 ml en een buitenvolume van 110 ml. Er zijn proeven uitgevoerd, waarbij in het begin van de dialyse alle ijzer in de buitenvloeistof gevoegd werd, en proeven waarbij alle ijzer aan de binnenvloeistof werd toegevoegd.

In tabel III-12 zijn de resultaten beschreven, verkregen bij uitwisselings-experimenten met Fe-59, die identiek werden uitgevoerd aan die welke reeds eerder werden vermeld.

De conclusie, die uit de diverse resultaten getrokken kan worden, is dat een extra toevoeging van bicarbonaat geen invloed heeft op de ligging van het evenwicht. Op de rol van het bicarbonaat in het transferrine-ijzersysteem zal in het volgende hoofdstuk nog nader worden ingegaan.

Tevens werden nog enkele dialyse-experimenten uitgevoerd, waarbij natrium-sulfiet werd toegevoegd in plaats van ascorbinezuur. Deze uitvoering geschiedde omdat wij wilden nagaan of een ander reductiemiddel van vergelijkbare sterkte, wat de  $E^0$  betreft, resultaten leverde welke te vergelijken waren met die verkregen bij ascorbinezuur toevoeging. De concentratie van het sulfiet was 3,0 mmol/l. In tabel III-13 staan de resultaten weergegeven van tegelijkertijd uitgevoerde experimenten, waarbij ascorbinezuur werd toegevoegd.

Tabel III-13

Vergelijking dialyse-experimenten met natrium-sulfiet resp. ascorbinezuur toevoeging.

experimenten zonder transferrine bij $\text{Na}_2\text{SO}_3$ toevoeging				experimenten met transferrine			
				sulfiet toevoeging		ascorbinezuur toevoeging	
dialysetijd in uren	ijzerconc. in binnen opl. $\mu\text{mol/l}$	ijzerconc. in buiten opl. $\mu\text{mol/l}$	transf. conc. $\mu\text{mol/l}$	ijzerconc. in binnen- opl. $\mu\text{mol/l}$	ijzerconc. in buiten- opl. $\mu\text{mol/l}$	ijzerconc. in binnen- opl. $\mu\text{mol/l}$	ijzerconc. in buiten- opl. $\mu\text{mol/l}$
0	0	12,5	25	0	12,1	0	12,5
62	12,5	12,2	25	39,0	10,4	42,5	11,0
0	0	26,0	25	0	26,0	0	26,0
62	24,0	25,3	25	60,5	22,8	65,0	22,6
0	0	55,0	25	0	55,0	0	56,0
62	45,5	46,4	25	86,1	37,7	89,0	36,3
0	0	50,2	25	0	50,2	0	50,2
62	49,0	48,3	25	93,0	46,6	100,0	46,4
0	0	18,5	25	0	18,5	0	18,5
62	16,0	15,7	25	30,0	12,7	33,0	12,2



Duidelijk blijkt, dat er geen wezenlijk verschil bestaat tussen de uitkomsten van de experimenten met ascorbinezuur en natriumsulfiet.

## DIALYSE-EXPERIMENTEN WAARBIJ WATERSTOFGAS WERD DOORGELEID

### Inleiding

Tegen het gebruikmaken van ascorbinezuur kunnen een aantal bezwaren worden aangevoerd. IJzer zou met ascorbinezuur een complex vormen (69). Verder rijst de vraag in hoeverre het ascorbinezuur in staat is de oxidatie van ijzer door opgelost zuurstof te verhinderen. Hoewel onze experimenten uitwezen, dat er weinig aanwijzingen zijn voor de aanwezigheid van een aanmerkelijke hoeveelheid Fe (III), wilden wij toch nog een reeks proeven doen met een geheel ander reductiemiddel. Wij kozen hiervoor waterstofgas. Het continu doorleiden van dit gas zal de zuurstof doen verdwijnen en bovendien de aanwezigheid van bicarbonaat tot een minimum beperken.. Wij voelden ook de behoefte  $K_1$  en  $K_2$  op grond van een andere rekenwijze te bepalen teneinde de eerder gevonden methode te controleren. Deze andere rekenwijze gaat uit van het begrip verzadigingspercentage. In het dialysezakje kan de concentratie van de totale hoeveelheid aanwezig ijzer bepaald worden. De concentratie van het ijzer, gebonden aan transferrine, is gelijk aan het concentratieverschil van de totale hoeveelheid ijzer en de hoeveelheid niet-gebonden ijzer. Dit laatste is bij de dialyseproef gelijk aan de ijzerconcentratie in de buitenvloeistof. Zoals reeds werd gesteld in dit hoofdstuk, is het mogelijk met deze gegevens het verzadigingspercentage uit te rekenen. Als verzadigingspercentage wordt genomen, de hoeveelheid ijzer gebonden aan transferrine, gedeeld door de hoeveelheid, die maximaal gebonden kan worden, vermenigvuldigd met 100. Deze maximaal te binden hoeveelheid ijzer is gelijk aan tweemaal de hoeveelheid transferrine, aangezien 1 mol transferrine 2 molen ijzer kan binden. Dus:

$$s = \frac{[\text{TrFe}] + 2[\text{TrFe}_2]}{2[\text{Tr}_O]} \times 100 \quad [14]$$

Tevens geldt weer:

$$\text{Tr}_O = [\text{Tr}] + [\text{TrFe}] + [\text{TrFe}_2]. \quad [6]$$

Dus:

$$s = \frac{[\text{TrFe}] + 2[\text{TrFe}_2]}{2[\text{Tr}] + [\text{TrFe}] + [\text{TrFe}_2]} \times 100 \quad [15]$$

Delen door  $[\text{TrFe}]$  geeft:

$$s = \frac{1 + \frac{2[\text{TrFe}_2]}{[\text{TrFe}]}}{2\left[\frac{[\text{Tr}]}{[\text{TrFe}]} + 1 + \frac{[\text{TrFe}_2]}{[\text{TrFe}]}\right]} \times 100 \quad [16]$$

In de evenwichtstoestand geldt ook:

$$K_1 = \frac{[\text{TrFe}]}{[\text{Tr}][\text{Fe}]} \quad \text{en} \quad K_2 = \frac{[\text{TrFe}_2]}{[\text{TrFe}][\text{Fe}]} \quad [3], [4]$$

Deze uitdrukkingen voor  $K_1$  en  $K_2$  ingevuld in [15] geeft:

$$s = \frac{1 + 2[\text{Fe}] \times K_2}{\frac{2}{K_1 \times [\text{Fe}]} + 2 + 2[\text{Fe}] \times K_2} \times 100 \quad [17]$$

Uit [17] blijkt, dat het verzadigingspercentage onafhankelijk is van de transferrineconcentratie en alleen afhangt van de betreffende "vrije" ijzerconcentratie.

De beide evenwichtsconstanten kunnen met behulp van uitdrukking [17] op dezelfde wijze worden berekend als uitgevoerd werd met behulp van [13]. De gevonden waarden van het verzadigingspercentage en van de bijbehorende concentratie "vrij" ijzer, verkregen in twee verschillende experimenten, werden in [17] gesubstitueerd. Uit de twee verkregen vergelijkingen kunnen dan  $K_1$  en  $K_2$  worden afgeleid via de rekenwijze die in hoofdstuk II is besproken.

De proefopstelling was identiek aan de eerder beschrevene. De samenstelling van het dialysemedium was ook dezelfde. Uiteraard ontbrak het ascorbinezuur. Het dialyseren geschiedde bij 25 of 37° C. Waterstof werd vanuit een cylinder door een oplossing, bevattende 15 gram pyrogallol in 100 ml geconcentreerde KOH oplossing met s.m. van 1,53, geleid en ver-

volgens door de buitenvloeistof met een snelheid van ongeveer 20 l/uur. Alvorens met de waterstofproef werd begonnen werd de dialysevloeistof vacuum gezogen en vervolgens werd 15 minuten waterstofgas doorgeleid. Het vacuum-zuigen werd tweemaal herhaald, teneinde de opgeloste zuurstof zoveel mogelijk te verwijderen. Hierna begon de definitieve  $H_2$  doorleiding gedurende de gehele dialysetijd, zoals opgemerkt.

Evenals bij de experimenten waarbij ascorbinezuur was toegevoegd, werd ook bij deze proefopstelling nagegaan welk verband bestond tussen de tijd en de toename van de ijzerconcentratie in het dialysezakje. Dit werd onderzocht zonder en met transferrine in dit compartiment. Op deze wijze werd een inzicht verkregen in de tijd, nodig om de evenwichtstoestand te bereiken. Bij deze experimenten werd het ijzergehalte in het dialysezakje bepaald op discrete tijdstippen. Hiertoe was het nodig voor ieder tijdstip een geheel experiment te doen, daar het dialysezakje moest worden geopend. Bij deze experimenten werd een temperatuur aangehouden van  $25^\circ C$ . De resultaten van dergelijke experimenten zijn weergegeven in de figuur III-5. Deze twee uitkomsten vertonen veel gelijkenis met de figuren III-3 en 4, waarbij ascorbinezuur gebruikt werd als reductans.

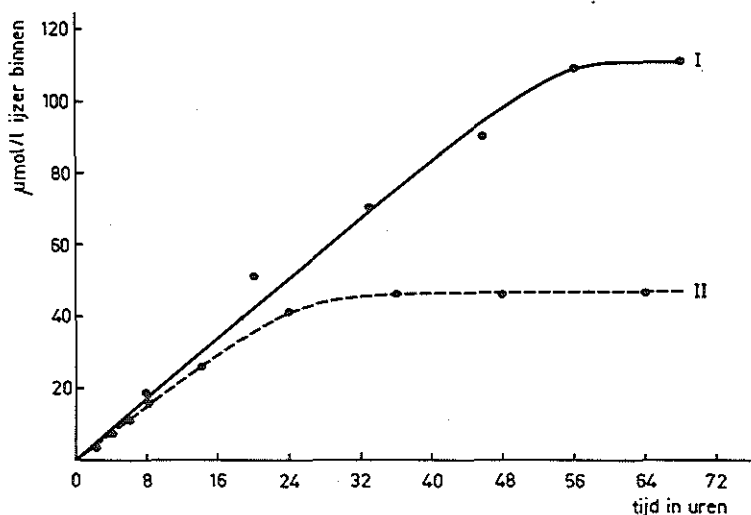


Fig. III-5. Invloed van de tijd op de dialyse-experimenten, waarbij waterstofgas werd doorgeleid. IJzer in binnenvloeistof bepaald.  
 Curve I: Transferrine in binnenvloeistof ( $50 \mu\text{mol/l}$ )  
 Curve II: Geen transferrine in binnenvloeistof.  
 Bij beide experimenten op tijdstip  $t = 0$  in buitenvloeistof aanwezig:  $50 \mu\text{mol/l}$  aan ijzer (II).

Op grond hiervan werd bij de proeven met waterstofgas een tijd aangehouden van 64 tot 72 uur voor de dialyse.

Tevens werd bij deze experimenten de valentietoestand van het ijzer voor en na dialyse bestudeerd. Toevoegen van 0,2 ml van een 2 molaire oplossing van thiocynaat aan 2 ml monster, aangezuurd met zoutzuur, leverde een negatief resultaat, terwijl de reactie met bathofenantroline, 0,25 g per 100 ml absolute alcohol, positief was. Als voorbeeld dienen de volgende waarden. Bij een experiment was in de buitenvloeistof 50 mol Fe (II) per liter gebracht. Aan een monster van 3 ml werd 1 ml 30% natriumacetaat (4 mol/l) en 0,1 ml bathofenantroline oplossing gevoegd en vervolgens 5x verdund. Bij meting van de extinctie bij 510 nm werd gevonden:

a. monster van de beginoplossing voor dialyse: 0,172.

b. monster van de buitenvloeistof na dialyse: 0,164.

Werd aan b. nog een extra hoeveelheid ascorbinezuur toegevoegd, dan bedroeg de extinctie 0,168.

Dit gaf ons de aanwijzing dat het ijzer in de tweewaardige vorm voorkwam tijdens de dialyse.

#### Experimenteel gedeelte

De dialyse-experimenten werden met diverse aantallen molen transferrine in het dialysezakje en ook diverse gehalten ijzer in de buitenvloeistof uitgevoerd. Bij elk experiment met transferrine in het dialysezakje werd ook een blanco proef gedaan. Hierbij was dus geen transferrine aanwezig. Het ijzer in de buitenvloeistof had dezelfde concentratie als bij het experiment met transferrine. De resultaten van een aantal experimenten staan hieronder in tabelvorm weergegeven (tabellen III-14 en III-15).

Niet alle resultaten van de blanco proeven zijn vermeld. Met een paar voorbeelden kan volstaan worden, aangezien de uitkomsten steeds identiek zijn. De concentraties aan ijzer binnen en buiten zijn gelijk aan het einde van de proef.

Tabel III-14

Enkele voorbeelden van blanco dialyse-experimenten, waarbij waterstofgas werd doorgeleid.

dialysetijd in uren	ijzerconc. in binnenopl. $\mu\text{mol/l}$	ijzerconc. in buitenopl. $\mu\text{mol/l}$	temp. in $^{\circ}\text{C}$
0	0	43,4	25
68	43,0	42,6	
0	0	49,2	25
68	48,5	48,6	
0	0	55,0	37
71	53,5	53,5	
0	0	61,9	25
68	58,2	59,1	
0	0	20,0	25
68	16,8	17,4	
0	0	47,4	37
71	45,5	46,0	

Tabel III-15

Enkele voorbeelden van dialyse-experimenten, waarbij waterstofgas werd doorgeleid.

dialysetijd in uren	in dialysezakje		in buitenopl.		temp. in $^{\circ}\text{C}$
	transf. conc. $\mu\text{mol/l}$	ijzerconc. $\mu\text{mol/l}$	ijzerconc. $\mu\text{mol/l}$	verzad. perc.	
0	60	0	20,8	35	37
71	60	61,5	17,6		
0	60	0	46,2	54	37
71	60	107,0	41,0		
0	60	0	58,0	67	37
71	60	136,5	55,0		
0	105	0	20,0	29	37
71	105	77,0	17,2		
0	105	0	48,8	48	37
71	105	143,0	44,0		
0	105	0	69,0	55	37
71	105	172,5	62,8		
0	105	0	43,2	43	25
68	105	128,5	39,2		
0	105	0	65,4	58	25
68	105	176,0	56,8		
0	115	0	48,0	47	25
68	115	148,5	43,8		
0	115	0	101,8	70	25
68	115	245,0	92,0		
0	115	0	192,0	93	25
68	115	395,0	176,0		

Berekening van de K-waarden voor het ijzertransferrine systeem met behulp van de gegevens verkregen uit de dialyseproeven, waarbij waterstof werd doorgeleid

Op dezelfde manier, als beschreven voor de resultaten verkregen met dialyseproeven waarbij ascorbinezuur was toegevoegd, werden  $K_1$  en  $K_2$  berekend. Gebruik makende van de resultaten uit tabel III-15 en vergelijking [17], werden de volgende K-waarden verkregen, met behulp van 30 paren vergelijkingen.

$$K_1 = 0,12 \times 10^6 \text{ met een standaardafwijking van het gemiddelde } 0,04 \times 10^6.$$

$$K_2 = 0,16 \times 10^5 \quad " \quad " \quad " \quad " \quad " \quad " \quad 0,08 \times 10^5.$$

## CONCLUSIE

Bij de diverse dialyse-experimenten, zoals hierboven beschreven, komt duidelijk tot uiting, dat het evenwicht, dat tussen transferrine en ijzer bestaat, minder sterk naar de complex kant ligt dan wordt verwacht op grond van de reeds genoemde literatuurgegevens.

In onze omstandigheden is sprake van een relatief hoge concentratie aan niet-gebonden ijzer bij de verschillende verzadigingspercentages. In de discussie zullen wij nog nader op de gegevens van de dialyse-experimenten terugkomen.

## HOOFDSTUK IV

### OPTISCHE METINGEN AAN HET TRANSFERRINE-IJZER COMPLEX

#### INLEIDING

In het literatuuroverzicht werd melding gemaakt van de rode kleur, die het ijzer-transferrine complex bezit. Dit feit werd reeds door Schade en Caroline in 1946<sup>10)</sup> vastgesteld. In 1949 namen Schade en medewerkers<sup>11)</sup> een absorptiespectrum op en constateerden een maximum bij 460 nm. De principes van een transferrine-bepalingstechniek werden door Schade en Caroline ook in 1946 aangegeven. In onderstaande figuur IV-1 is een en ander weergegeven. Deze techniek komt neer op het toevoegen van een equivalente hoeveelheid ijzer; dit laatste volgt uit metingen bij 460 nm. Ook andere onderzoekers<sup>59)</sup> ontwikkelden soortgelijke methoden, een enkele heeft in de klinische chemie gedurende een bepaalde periode uitgebreide toepassing gevonden<sup>70)</sup>.

Ook werd in het literatuuroverzicht ingegaan op de diverse opvattingen die met betrekking tot de omstandigheden, die noodzakelijk zijn voor het ontstaan van het absorptiespectrum, bijvoorbeeld de aanwezigheid van bicarbonaat. Op dit gebied bestaat geen eensluidende mening, verderop in deze inleiding wordt hierop teruggekomen, aangezien een en ander invloed zou kunnen hebben op onze proefopzet.

Het leek ons wenselijk de resultaten voor  $K_1$  en  $K_2$ , die verkregen waren met de dialyse-experimenten, zo mogelijk te vergelijken met resultaten van proeven waarbij van bovenstaande optische eigenschap van het transferrine-ijzer complex gebruik wordt gemaakt. In hoofdstuk III is hierop

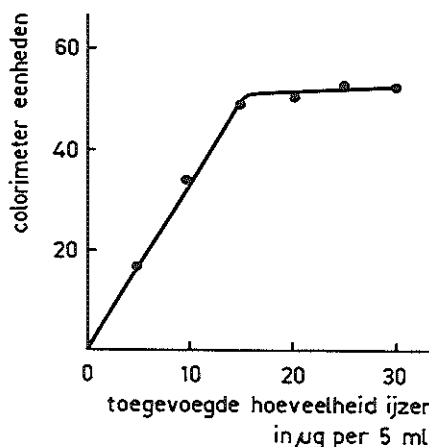


Fig. IV-1. Verband tussen de hoeveelheid ijzer toegevoegd aan serum en de rode kleur, gemeten bij 460 nm, volgens Schade en Caroline<sup>10)</sup>.

reeds gezinspeeld. Zoals aldaar vermeld wordt, is het mogelijk de vrije ijzerconcentratie te berekenen, wanneer bekend zijn  $[\text{Tr}]_{\text{totaal}}$  en  $[\text{TrFe}] + 2[\text{TrFe}_2]$ . Wanneer ook de totale ijzerconcentratie bekend is, kunnen zoals in het vorige hoofdstuk werd uiteengezet  $K_1$  en  $K_2$  berekend worden. De betreffende formules zijn in principe in hoofdstuk III reeds afgeleid, maar gezien het feit, dat een enigszins andere rekenwijze wordt gebruikt bij de verwerking van de resultaten van de optische metingen volgt hier de complete afleiding.

Deze rekenwijze gaat uit van het begrip verzadigingspercentage, zoals dit is beschreven in de inleiding van de dialyseproeven waarbij waterstofgas werd doorgeleid.

Het verzadigingspercentage werd aldaar als volgt geformuleerd:

$$s = \frac{[\text{TrFe}] + 2[\text{TrFe}_2]}{2 \times [\text{Tr}_0]} \times 100 \quad [14]$$

Tevens geldt de ijzerbalans:

$$[\text{Fe}_0] = [\text{Fe}] + [\text{TrFe}] + 2[\text{TrFe}_2] \quad [5]$$

Uit [14] en [5] volgt:

$$[\text{Fe}_0] - 2[\text{Tr}_0] \times \frac{s}{100} = [\text{Fe}] \quad [18]$$



Wanneer dus het verzadigingspercentage bekend is dan kan het niet-gebonden ijzer worden berekend.

Het verzadigingspercentage kan bij deze optische experimenten berekend worden uit de waarde van de extinctie gemeten bij 470 nm.

Aan de transferrine-oplossing, waarmee de experimenten verricht werden, werden hoeveelheden ijzer toegevoegd totdat de extinctie bij 470 nm niet meer veranderde. Dit werd als de extinctie, behorende bij 100% verzadiging beschouwd. Wanneer een gemeten extinctie bij 470 nm van een ijzertransferrinemengsel gedeeld wordt door de gevonden maximale extinctie, is het verzadigingspercentage bekend. Aangenomen werd, dat de extinctie bij 470 nm rechtevenredig is met het verzadigingspercentage; dit op grond van literatuurgegevens dat de beide bindingsplaatsen identiek zijn<sup>44)</sup>.

In het hierboven aangehaalde hoofdstuk III werd door de uitwerking van de resultaten van de dialyse-experimenten een andere schrijfwijze voor het verzadigingspercentage gebruikt, die hier nogmaals wordt weergegeven [17].

$$s = \frac{1 + 2 \times K_2 \times [\text{Fe}]}{\frac{2}{K_1 \times [\text{Fe}]} + 2 + 2 \times K_2 \times [\text{Fe}]} \times 100 \quad [17]$$

Uitgaande van de resultaten van proeven waarbij verschillende verzadigingspercentages zijn gemeten en tevens de bijbehorende ijzerconcentraties werden berekend met vergelijking [18] kunnen  $K_1$  en  $K_2$  worden berekend. Voor ieder experiment kan een vergelijking worden opgesteld door de waarde van  $s$  en bijbehorende  $[\text{Fe}]$  in [17] in te vullen.

Door deze werkwijze ontstaan een aantal vergelijkingen, waarin  $K_1$  en  $K_2$  de onbekenden zijn. Door combinaties van twee vergelijkingen te maken, zoals in het vorige hoofdstuk is uiteengezet, zijn deze  $K_1$  en  $K_2$  te berekenen.

Ook kan met behulp van de gegevens die met de optische metingen verkregen zijn de molaire extinctiecoëfficiënten van  $\text{TrFe}$  en  $\text{TrFe}_2$  bij 470 nm bepaald worden. Dit kan als volgt worden toegelicht:

Gebruik makende van formule [11] uit het vorige hoofdstuk,

$$[\text{Tr}] = \frac{[\text{Fe}] + 2[\text{Tr}_0] - [\text{Fe}_0]}{K_1 \times [\text{Fe}] + 2} \quad [11]$$

kan de concentratie transferrine berekend worden.

Op dezelfde pagina in hoofdstuk III staan de concentraties van de beide complexen uitgedrukt in  $[Fe]$ ,  $[Tr]$ ,  $[Fe_O]$  en  $[Tr_O]$  te weten:

$$[TrFe] = -2[Tr] + [Fe] + 2[Tr_O] - [Fe_O] \quad [7]$$

$$[TrFe_2] = [Fe_O] + [Tr_O] - [Fe] - [Tr] \quad [8]$$

Op deze wijze zijn dus de concentraties van alle onderdelen van het transferrine-ijzer systeem bekend. Hierdoor is het mogelijk geworden de molaire extinctiecoëfficiënt van de beide complexen te berekenen.

Immers:

$$E_{470} = \epsilon_{TrFe}^{470} \times [TrFe] + \epsilon_{TrFe_2}^{470} \times [TrFe_2] \quad [19]$$

Hierbij is  $E_{470}$  de extinctie bij 470 nm gemeten en zijn  $\epsilon_{TrFe}^{470}$  en  $\epsilon_{TrFe_2}^{470}$  de molaire extinctiecoëfficiënten van de beide complexen.

$\epsilon_{TrFe_2}^{470}$  is te bepalen door te stellen, dat bij de maximale extinctie  $TrFe$  gelijk is aan nul zodat:

$$E_{470} = \epsilon_{TrFe_2}^{470} \times [TrFe_2]$$

Door verschillende concentraties te nemen werd de  $\epsilon_{TrFe_2}^{470}$  bepaald.

Met behulp van [19] en de berekende  $[TrFe]$  en  $[TrFe_2]$  volgens [7] en [8] was het mogelijk  $\epsilon_{TrFe}^{470}$  te bepalen.

Een moeilijk punt vormt het feit dat, zoals in het begin van deze inleiding is opgemerkt, geen eensluitend standpunt bestaat met betrekking tot de invloed van anionen op de ijzertransferrine binding.

In het literatuuroverzicht werden diverse standpunten vermeld. Voor onze proefopzet in dit hoofdstuk was het noodzakelijk enkele experimenten te doen over de opmerkingen van Young en Perkins<sup>45)</sup> aangaande de invloed van fosfaationen.

## HET ONTWIKKELEN VAN DE PROEFOPZET

Aangezien ook bij deze experimenten de evenwichtstoestand van het transferrine-ijzer systeem bestudeerd werd en niet de reactie-kinetiek, die in hoofdstuk VI wordt besproken, werd een werkwijze gevolgd, die in essentie dezelfde is als bij de dialyse-experimenten.

De proefopzet, bedoeld om de gegevens te leveren voor de berekening van  $K_1$  en  $K_2$  en de molaire extinctiecoëfficiënten van  $\text{TrFe}$  en  $\text{TrFe}_2$ , werd daarom als volgt gekozen:

Meetoplossing: Hoeveelheden transferrine wisselend van 100 tot 260  $\mu\text{mol/l}$  opgelost in 0,05 molaire fosfaat buffer pH 7,4 waaraan was toegevoegd ascorbinezuur (3 mmol/l), bicarbonaat (25 mmol/l) en wisselende hoeveelheden ijzer (II) sulfaat, nl. 10 tot 800  $\mu\text{mol/l}$ .

De blanco oplossing was identiek aan de meetoplossing, alleen de toevoeging van het ferrosulfaat ontbrak.

Een aantal problemen betreffende de proefopzet dienen bediscussieerd te worden.

De vraag is nog steeds niet afdoende beantwoord of het bicarbonaat bij de binding en bij de extinctie bij 470 nm invloed heeft. Aangezien wij de optische experimenten uitvoerden met oplossingen die in contact waren met de buitenlucht, was het niet mogelijk de aanwezigheid van  $\text{HCO}_3^-$  te vermijden. Zoals reeds vermeld in het vorige hoofdstuk is de concentratie van  $\text{HCO}_3^-$  in dit door ons gebruikte milieu bij pH 7,4 minstens gelijk aan 0,3 mmol/l. Teneinde het probleem van de bicarbonaat invloed te omzeilen, voegden wij deze stof toe in de aangegeven concentratie. Volgens Ross en Kochwa<sup>42)</sup> die een invloed van  $\text{HCO}_3^-$  op de extinctie bij 470 nm bestudeerden, is een concentratieverhouding  $\text{HCO}_3^- : \text{Fe}$  gelijk aan 50 voldoende om een maximale extinctie te verkrijgen.

Een spectrum werd opgenomen van een transferrine-ijzermengsel, waaraan de beschreven extra hoeveelheid bicarbonaat was toegevoegd. Dit vertoonde geen verschil met het spectrum van een oplossing waarin geen extra bicarbonaat was toegevoegd. Toch werd bicarbonaat toegevoegd, mede omdat de reactie tussen transferrine en ijzer door deze handelswijze sterk wordt versneld zoals in hoofdstuk VI zal blijken. Nagegaan werd of ook de fosfaatbuffer invloed had op het spectrum. Dit naar aanleiding van de opvatting van Young en Perkins<sup>45)</sup>, besproken in de inleiding. Hiertoe werd zonder bufferionen gewerkt; de pH werd zoveel mogelijk op 7,4 gehouden met

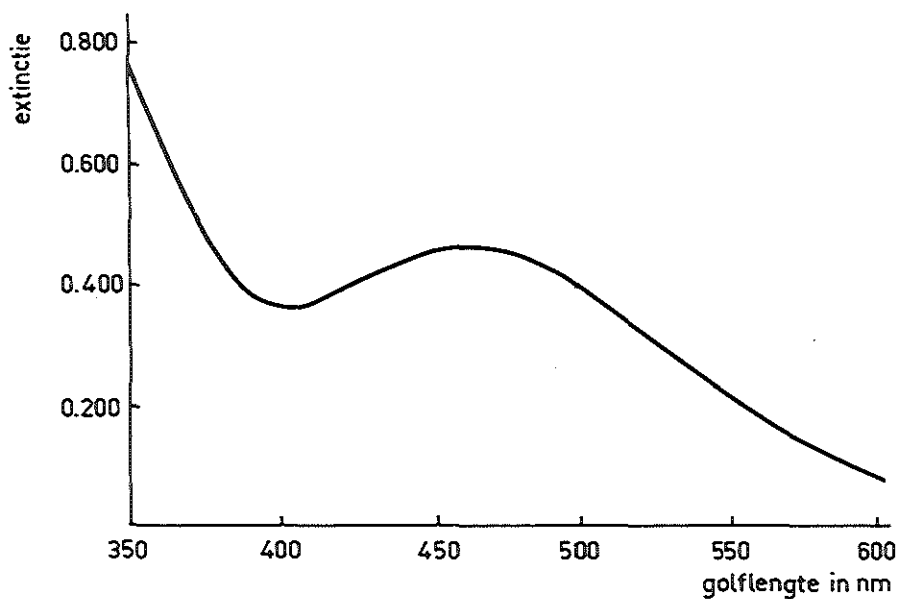


Fig. IV-2. Absorptie-spectrum van het ijzertransferrine complex in fofaatbuffer. Hierbij zijn de ijzer (II)- en transferrine-concentraties respectievelijk 200 en 100  $\mu\text{mol/l}$ . Spectrum opgenomen 24 uur na bijeenvoegen van de reagentia. pH = 7,4.

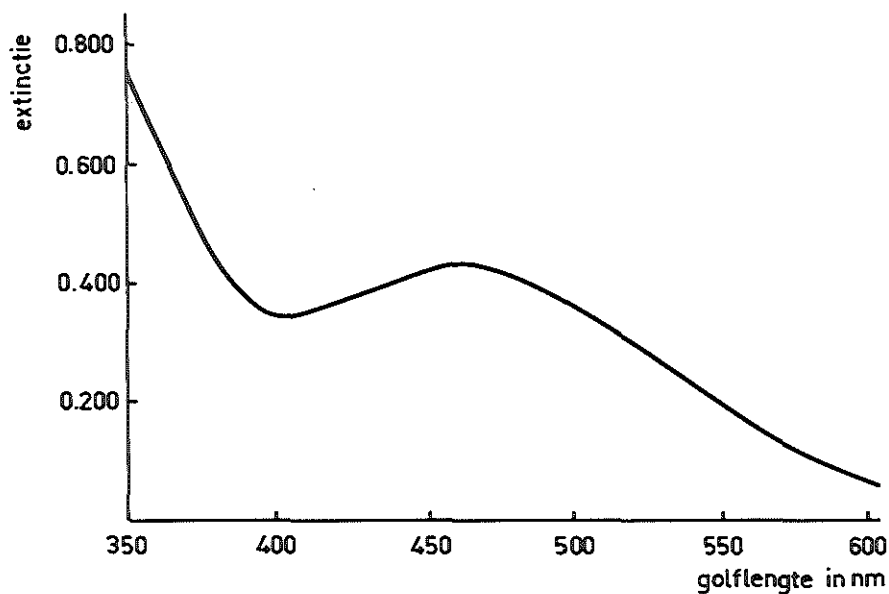


Fig. IV-3. Absorptie-spectrum van het ijzertransferrine complex in water. De ijzer (II)- en transferrine-concentraties bedragen respectievelijk 200 en 100  $\mu\text{mol/l}$ . Spectrum opgenomen 24 uur na bijeenvoegen van de reagentia. pH = 7,4 met behulp van een natriumhydroxide-oplossing (0,05 M).

behulp van toevoeging van natriumhydroxide. De gevolgde methodiek staat beschreven in hoofdstuk II. De verkregen spectra staan weergegeven in de figuren IV-2 en IV-3.

Alvorens een conclusie wordt gegeven, is het nodig in te gaan op een ander belangrijk punt, namelijk de tijd die het mengsel transferrine en ijzer moet worden gelaten om te komen tot de evenwichtstoestand. De reactietijd, zoals die voor deze experimenten werd gekozen, bedroeg 24 uur. Dat deze tijd lang genoeg is om tot een evenwichtstoestand te komen, werd uitgezocht tezamen met de metingen van de spectra. De conclusies die uit de spectra getrokken kunnen worden, zijn dat

- bij een reactietijd van 24 uur spectra ontstaan die vergelijkbaar zijn met die welke in de literatuur zijn beschreven.
- de spectra onderling weinig verschillen vertonen; van een invloed van fosfaat dat storend zou kunnen werken, is geen sprake. Het kan zijn dat Young en Perkins ongelijk hebben, maar het kan ook zijn dat de overmaat bicarbonaat de invloed van fosfaat teniet doet.
- de extinctie bij 470 nm niet groter werd wanneer de reactietijd langer dan 24 uur werd genomen. Dit blijkt uit tabel IV-1.

Tabel IV-1

Het vaststellen van de evenwichtstoestand met behulp van het meten van de extinctie bij 470 nm in de loop van de tijd.

Samenstelling van het reactiemengsel per ml	E <sub>470</sub> na respectievelijk (in uren)			
	7	24	48	60
0,25 $\mu$ mol Tr + 0,5 $\mu$ mol(Fe)II + 3 mmol Vit C	930	1160	1160	1160
0,25 $\mu$ mol Tr + 0,5 $\mu$ mol(Fe)II + 3 mmol Vit C + 25 mmol HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	980	1160	1160	1160

Ook met andere experimenten werden gelijklopende resultaten verkregen.

#### OPTISCHE METINGEN AAN HET TRANSFERRINE-IJZER COMPLEX

In figuur IV-4 en IV-5 staan enkele series van dergelijke experimenten weergegeven. De transferrine concentraties zijn uitgedrukt in  $\mu$ mol/l, evenals die van het toegevoegd ijzer. De blanco-oplossing waartegen gemeten werd, bestond uit een transferrine-oplossing in dezelfde concentratie als die welke in de meetcuve aanwezig was.

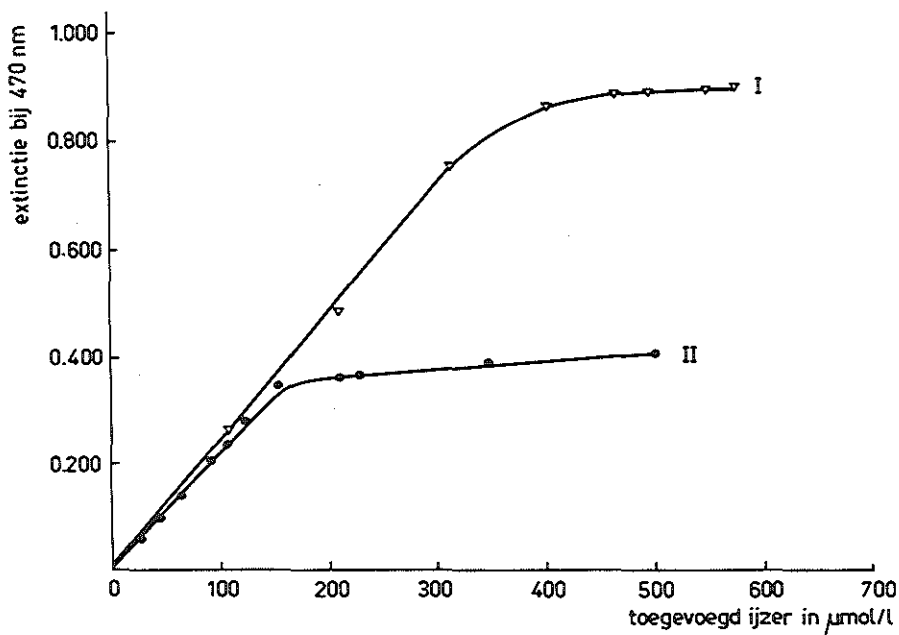


Fig. IV-4. Verband tussen de extinctie bij 470 nm en de hoeveelheid toegevoegd ijzer.  
 Experiment I: transferrine-concentratie =  $170 \mu\text{mol/l}$ .  
 Experiment II: transferrine-concentratie =  $100 \mu\text{mol/l}$ .

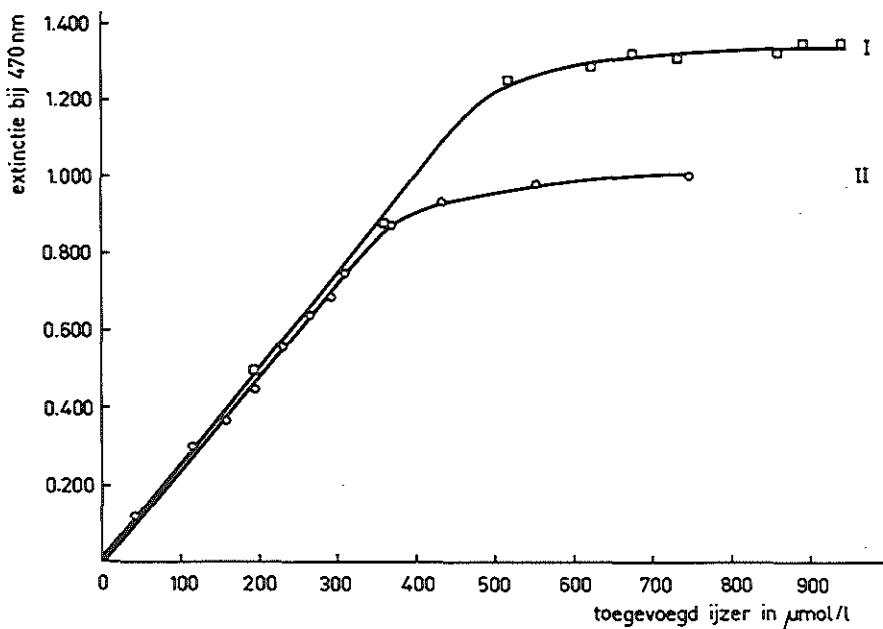


Fig. IV-5. Verband tussen de extinctie bij 470 nm en de hoeveelheid toegevoegd ijzer.  
 Experiment I: transferrine-concentratie =  $260 \mu\text{mol/l}$ .  
 Experiment II: transferrine-concentratie =  $200 \mu\text{mol/l}$ .

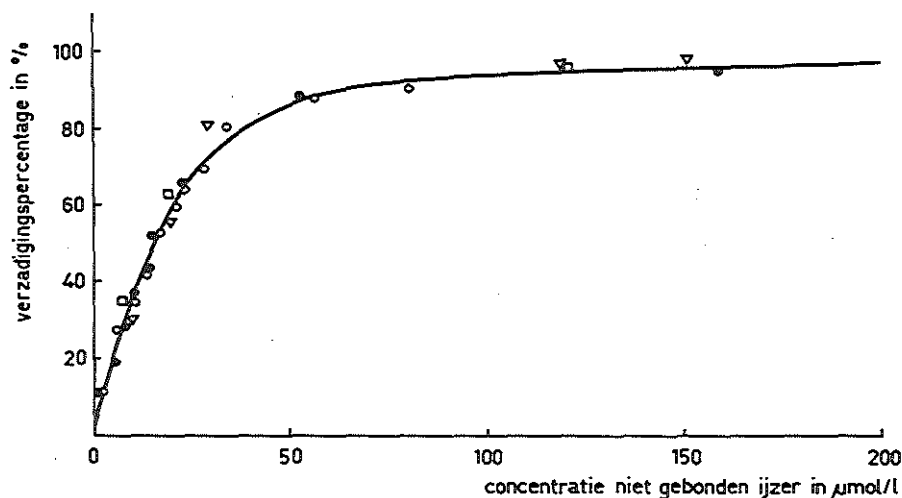


Fig. IV-6. Verband tussen verzadigingspercentage van transferrine en concentratie niet-gebonden ijzer. Verklaring der tekens:

- x transferrine-concentratie = 100  $\mu\text{mol/l}$ .
- v transferrine-concentratie = 170  $\mu\text{mol/l}$ .
- o transferrine-concentratie = 200  $\mu\text{mol/l}$ .
- transferrine-concentratie = 260  $\mu\text{mol/l}$ .

In figuur IV-6 zijn voor deze vier transferrine concentraties de verzadigingspercentages uitgezet als functie van het niet-gebonden ijzer. Deze niet-gebonden ijzerconcentratie is uitgerekend met behulp van vergelijking [18]. De  $K_1$ - en  $K_2$ -waarden werden berekend met gebruikmaking van [17] door steeds twee experimenten te combineren en de waarden van de verzadigingspercentages en de concentraties van het niet-gebonden ijzer, die bij deze experimenten behoren, in deze vergelijking te substitueren.

Gevonden werden uit 40 combinaties de volgende waarden voor  $K_1$  en  $K_2$ :

$$K_1 = (0,2 \pm 0,1) \times 10^6 \quad \text{en} \quad K_2 = (0,5 \pm 0,3) \times 10^5.$$

Door bij elk experiment de hierbij gevonden waarden voor de  $K_1$  en  $K_2$  te gebruiken, werden  $[\text{Tr}]$ ,  $[\text{TrFe}]$  en  $[\text{TrFe}_2]$  berekend met behulp van [11], [8] en [7] respectievelijk.

De resultaten van de berekeningen, respectievelijk bepalingen van de hierboven vermelde componenten, staan vermeld in de tabellen IV-2 en IV-3.

Tabel IV-2

Resultaten van enkele optische experimenten en de resultaten van de berekeningen van de diverse componenten.

conc transf. $\mu\text{mol/l}$	toegevoegd ijzer $\mu\text{mol/l}$	$E_{470}$	verzadi- gings- graad in %	[Fe] $\mu\text{mol/l}$	[Tr] $\mu\text{mol/l}$	[TrFe] $\mu\text{mol/l}$	[TrFe <sub>2</sub> ] $\mu\text{mol/l}$
170	110	0,265	30	8	85	68	17
170	209	0,495	55	21	24	104	42
170	308	0,755	84	28	5	50	115
170	460	0,880	97	130	0,7	9,3	160
170	485	0,885	97,5	155	0,4	9,6	160
170	540	0,895	100	200	0	0	170
170	550	0,900	100	210	0	0	170
170	570	0,900	100	230	0	0	170
100	23	0,059	10,5	2	82	16	2
100	44	0,099	19,5	5	64	32	4
100	65	0,147	28,5	8	51	41	8
100	85	0,205	37	11	40	45	14,5
100	101	0,240	44	13	30	50	20
100	120	0,285	53	14	27,5	39	33,5
100	157	0,350	67	23	16	36	58
100	215	0,465	88	39	2,4	19,5	78
100	229	0,466	88	53	3	17	80
100	350	0,490	93	164	0	13	87
100	500	0,515	100	300	0	0	100

Tabel IV-3

Als tabel IV-2

conc transf. $\mu\text{mol/l}$	toegevoegd ijzer $\mu\text{mol/l}$	$E_{470}$	verzadi- gings- graad in %	[Fe] $\mu\text{mol/l}$	[Tr] $\mu\text{mol/l}$	[TrFe] $\mu\text{mol/l}$	[TrFe <sub>2</sub> ] $\mu\text{mol/l}$
260	192	0,480	35,5	8	103	122	35
260	354	0,875	64	20	31	124	105
260	625	1,290	95	130	1	24	235
260	720	1,305	97	216	0	16	244
260	734	1,310	97	250	0	16	244
260	863	1,330	98	353	0	7	253
260	885	1,340	99	370	0	5	255
260	930	1,345	100	410	0	0	260
200	45	0,120	10,5	2	163	31	6
200	111	0,300	26	7	110	76	15,5
200	152	0,370	35	12	81	98	21,0
200	186	0,450	43	14	67	94	39,0
200	230	0,560	53	18	49,5	89	61,5
200	261	0,645	60	21	39	82	79
200	283	0,685	65	23	32,5	75	92
200	307	0,740	70	27	25,5	69	105,5
200	368	0,870	83	36	12	44	144
200	400	0,900	86	56	8	40	152
200	431	0,930	88	79	5	38	157
200	750	1,000	100	350	0	0	200



De berekende concentraties van  $[\text{Fe}]$ ,  $[\text{Tr}]$ ,  $[\text{TrFe}]$  en  $[\text{TrFe}_2]$  zijn ook nog grafisch weergegeven in figuur IV-7, waarbij deze componenten uitgedrukt zijn als functies van de verzadigingspercentages.

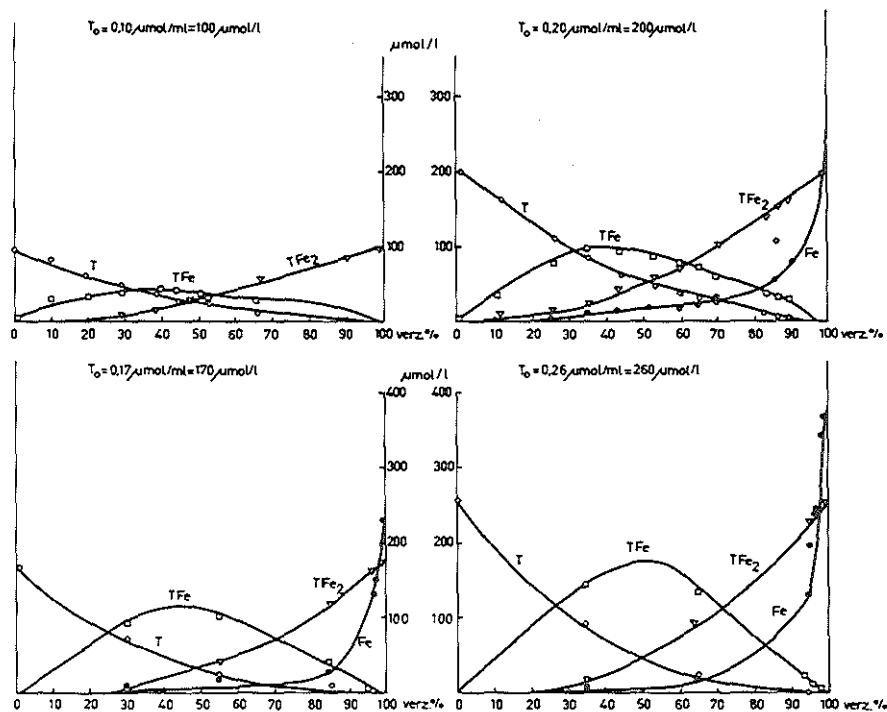


Fig. IV-7. Concentraties van de diverse componenten van het ijzertransferrine systeem als functie van het verzadigingspercentage van transferrine.

Met behulp van de diverse gegevens uit de tabellen en vergelijking [19], werden de molaire extinctiecoëfficiënten bepaald voor de beide transferrine-ijzer complexen.

Gevonden werden de volgende waarden:

$$\epsilon_{\text{TrFe}}^{470} = 2600 \pm 100 \text{ mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1} \times \text{l}$$

$$\epsilon_{\text{TrFe}_2}^{470} = 5200 \pm 200 \text{ mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1} \times \text{l}$$

## CONCLUSIE

Uit de resultaten van de hier beschreven optische experimenten blijkt, dat ook met deze methode, dezelfde orde van grootte voor de evenwichtsconstanten wordt gevonden.

De waarde voor de molaire extinctie coëfficiënten voor het transferrine complex waaraan 2 ijzer ionen zijn gebonden stemt goed overeen met de waarde die uit de literatuur bekend is.

Surgenor en medewerkers<sup>17)</sup> vonden  $E_{470}^{1\%} = 0,570$ .

Omgerekend geeft dit voor de molaire extinctiecoëfficiënt  $5100 \text{ mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1} \times \text{l}$ .

## HOOFDSTUK V

### ELECTRONSPINRESONANTIE-METINGEN AAN HET TRANSFERRINE-IJZER COMPLEX

#### INLEIDING

Bij de bestudering van de  $K_1$  en  $K_2$  van de transferrine-ijzer complexen maakten wij gebruik van ijzer (II) om redenen die uiteengezet zijn. Uit het literatuuroverzicht blijkt dat bij de proeven, die de laatste jaren met transferrine zijn gedaan, hoofdzakelijk van ijzer (III) werd uitgegaan. In de begintijd was dit anders, toen werd veelvuldig Fe (II) gebruikt. De overgang op het gebruik van Fe (III) is begrijpelijk, want reeds Surgenor en medewerkers<sup>17)</sup> vermeldde dat zij op grond van niet gepubliceerde gegevens van Michaelis, verkregen met behulp van magnetische susceptibiliteitsmetingen, tot de conclusie zijn gekomen, dat in het ijzertransferrine complex het ijzer driewaardig is. Zoals werd vermeld, is door Ehrenberg en Laurell<sup>37)</sup> vastgesteld dat transferrine van het varken opgeladen met Fe (II) inderdaad driewaardig ijzer bevat. Dit onderzoek werd eveneens verricht met magnetische susceptibiliteitsmetingen.

Aasa en medewerkers onderzochten in 1963<sup>43)</sup> met behulp van electronspinresonantie-spectra het ijzertransferrine, verkregen door transferrine met Fe (III) op te laden.

Gezien het feit dat wij steeds met Fe (II) werkten, leek het wenselijk te onderzoeken of het complex, ontstaan uit humaan transferrine en Fe (II), dat door ons werd bestudeerd, dezelfde karakteristieke eigenschappen vertoonde als het complex dat Aasa e.a. verkregen uit humaan transferrine en

Fe (III). Het opnemen van de E.S.R.-spectra was mogelijk in het laboratorium voor kristalchemie van de Rijksuniversiteit te Utrecht, dankzij de medewerking van Prof. M.P. Groenewege en Dr. D.H. Zijp. Bij het opnemen en interpreteren van de spectra werden wij terzijde gestaan door de heer C.W. Worrell\*.

Uiteraard zal in het navolgende niet in extenso worden ingegaan op de theoretische achtergronden van de E.S.R.-techniek. Slechts voor zover dit nodig is voor een goed begrip van de door ons opgenomen spectra wordt een kort overzicht gegeven van de principes waarop deze techniek berust.

Een om zijn eigen as draaiend electron is op te vatten als een magnetische dipool. Als deze dipool, met een magnetisch moment  $\mu$ , zich in een magnetisch veld met veldsterkte  $H$  bevindt, zijn er twee stationaire toestanden mogelijk, te weten  $H$  en  $\mu$  parallel of tegengesteld gericht. Het energieverval tussen deze twee toestanden is  $2 H$ . Wanneer loodrecht op het constante magneetveld een magnetisch wisselveld wordt aangelegd, kunnen overgangen tussen de twee energietoestanden optreden wanneer de frequentie  $\nu$  voldoet aan  $h\nu = g\beta_e H$ , waarin  $\beta_e$  het Bohrse magneton van het electron is en  $g$  de factor van Landé. Er treedt dan electronspinresonantie op met een resonantie-frequentie  $\nu$ . Dit is vast te stellen doordat energie uit het hoogfrequentieveld wordt opgenomen. Een spectrum kan worden opgenomen door bij verschillende veldsterkten te meten.

Uit deze spectra kunnen verschillende gegevens worden afgeleid:

- a. Ongepaarde electronen geven een absorptie, gepaarde niet. Er bestaat een verschil tussen Fe (III) dat absorptie veroorzaakt en Fe (II) dat dit niet doet.
- b. De energie-absorptie is evenredig met het totaal aantal aanwezige ongepaarde electronen. Aangezien dit aantal nauw samenhangt met het aantal atomen, kan uit de mate van energie-absorptie het gehalte aan Fe (III) afgeleid worden.
- c. Het spectrum is karakteristiek voor een bepaald ion in een bepaalde omgeving. De grootte waarmee de karakterisering kan gebeuren is

\* Wij zijn Prof. M.P. Groenewege en zijn medewerkers zeer erkentelijk voor hun medewerking bij het experimentele onderzoek en voor het uitbrengen van hun oordeel over het betreffende hoofdstuk en de bijbehorende discussie.

de factor  $g$  die volgt uit  $h\nu = g\beta_e H$ , de basis-energie-vergelijking van de E. S. R. Hierin is  $h$  de constante van Planck en  $g$  de factor van Landé. Voor de geheel vrije spin heeft deze de getalwaarde 2,0023.

Opgemerkt moet worden, dat in het zojuist gestelde een zekere simplificatie aanwezig is. De wijze waarop een atoom in een molecuul is gebonden, heeft invloed op de electronspin van een electron uit dit atoom. En zo zijn nog andere factoren te noemen die tot voorzichtigheid manen bij de interpretatie van de spectra. In de discussie wordt hierop teruggekomen voor zover dit met betrekking tot onze conclusies noodzakelijk is.

Bij het onderzoek dat in dit hoofdstuk wordt beschreven, waren de probleemstellingen de volgende:

1. Is er een verschil tussen het E. S. R.-spectrum van transferrine-ijzer ontstaan uit transferrine en Fe (II) en het E. S. R.-spectrum van transferrine-ijzer ontstaan uit transferrine en Fe (III).
2. Is er verschil tussen de E. S. R.-spectra van de transferrine-ijzer complexen ontstaan uit transferrine en Fe (II) of Fe (III) bij diverse verhoudingen ijzer: transferrine.
3. Is er een verschil tussen de E. S. R.-spectra van de transferrine-ijzer complexen ontstaan uit transferrine en ijzer in afwezigheid en aanwezigheid van andere serum componenten.

Opgemerkt dient te worden, dat de eerste vraagstelling de voornaamste was in het raam van ons onderzoek. Het leek mogelijk en gewenst vast te stellen of onze proefopzet met Fe (II) tot een geheel ander produkt leidde dan de proefopzet van Davis en medewerkers<sup>56)</sup> en Aasa en medewerkers<sup>43)</sup> met Fe (III).

Het feit dat de mogelijkheid zich voordeed een reeks andere proeven met de E. S. R.-techniek te verrichten, leidde tot de probleemstellingen 2 en 3.

## ONTWIKKELING VAN DE PROEFOPZET

Op dezelfde wijze als in hoofdstuk IV beschreven bij de proefopzet van de optische experimenten, wilden wij ook bij deze experimenten zoveel mogelijk de omstandigheden van onze dialyse-experimenten benaderen. Dit om zodoende een opzet te verkrijgen die zoveel mogelijk conclusies toelaat over ons dialyse systeem.

Transferrine was opgelost in 0,05 M fosfaat buffer pH 7,4 (De concentratie

van het eiwit varieerde van 25-500  $\mu\text{mol/l}$ .

Bij de experimenten waarbij met ijzer als Fe (II) werd gewerkt, was aan de buffer ascorbinezuur toegevoegd in een concentratie van 3 mmol/l. Dit geschiedde niet bij de experimenten met Fe (III). Het toegevoegde ijzer in de oplossingen waaraan gemeten moest worden, was aanwezig in een concentratie van 25-1000  $\mu\text{mol/l}$ , afhankelijk van de aard van het experiment. Na toevoeging van het ijzer aan de transferrine-oplossing werd de gewenste tijd gewacht, afhankelijk van de aard van het experiment. In de meeste gevallen bedroeg deze tijd 24 uur. Hierna werd door middel van vriesdrogen het monster geschikt gemaakt voor het opnemen van het E.S.R.-spectrum. De gehalten aan ijzer en transferrine per gram droge stof werden met de gebruikelijke chemische technieken bepaald; de opgave is in  $\mu\text{mol/gram}$  droge stof.

Zoals vermeld is het mogelijk door de meting van de energie-absorptie het gehalte aan Fe (III) vast te stellen (Zie voor de technische bijzonderheden hoofdstuk II). De uitkomsten van deze metingen kunnen dus vergeleken worden met het totale ijzergehalte, dat langs chemische weg is bepaald.

Allereerst werd een aantal inleidende experimenten uitgevoerd teneinde voor de interpretatie storende factoren op te sporen, indien deze zouden bestaan. Nagegaan werd of transferrine zonder ijzer toevoeging een resonantiepiek vertoonde. Dit bleek niet het geval. Toevoeging van ascorbinezuur aan een transferrine-oplossing gaf eveneens geen E.S.R.-signaal te zien. Verder werd nagegaan of het gebruikte  $\text{FeCl}_3$  de juiste resonantiepiek vertoonde en of de hieruit te berekenen Fe (III) concentratie binnen de foutengrens overeenkwam met de toegevoegde hoeveelheid. Deze experimenten vielen positief uit. Het opgenomen spectrum van  $\text{FeSO}_4$  vertoonde een geringe resonantie. Hieruit werd geconcludeerd dat deze stof 5% Fe (III) bevatte.

Conrad en medewerkers stelden in 1968<sup>69)</sup> op grond van metingen van absorptie spectra, dat Fe (II) met ascorbinezuur een complex kan vormen, waarin ijzer driewaardig is. Ook wanneer Fe (III) aan ascorbinezuur wordt toegevoegd zou deze verbinding ontstaan. Wij onderzochten de E.S.R.-spectra van monsters waarin Fe (II) en ascorbinezuur en Fe (III) en ditzelfde zuur waren samengevoegd. Deze experimenten werden uitgevoerd, uitgaande van oplossingen die in pH varieerden van 2 tot 8, deze pH verhoging geschiedde door toevoeging van NaOH en tevens in de fosfaatbuffer (pH 7,4), die bij het gehele onderzoek

gebruikt was.

Uit de E.S.R.-spectra kon tot de afwezigheid van Fe (III) worden besloten. Wij vonden dus geen aanwijzing voor Fe (III) binding met ascorbinezuur en kunnen verder aannemen dat ascorbinezuur in onze proefopzet Fe (III) tot Fe (II) reduceert. Ook van deze experimenten zijn de technische bijzonderheden te vinden in hoofdstuk II.

## UITGEVOERDE EXPERIMENTEN EN VERKREGEN RESULTATEN

De experimenten, die in het navolgende zullen worden besproken, zijn als volgt in te delen:

- experimenten met transferrine en Fe (II) respectievelijk Fe (III)
- experimenten met serum zonder verdere toevoegingen
- experimenten met serum na toevoeging van extra ijzer, zowel Fe (II) als Fe (III)
- experimenten met serum na toevoeging van extra transferrine en extra ijzer, zowel Fe (II) als Fe (III)
- experimenten met gedialyseerd serum en toevoeging van extra transferrine en extra ijzer, zowel Fe (II) als Fe (III).

ad a. Ongeveer 10 spectra van verschillende preparaten, verkregen door transferrine met ijzer (II) of ijzer (III) te laten reageren, werden opgenomen teneinde na te gaan of er verschillen bestonden tussen de uit ijzer (II) of ijzer (III) ontstane transferrine-ijzerbinding.

Deze proef werd verricht, uitgaande van diverse concentratieverhoudingen tussen transferrine en ijzer.

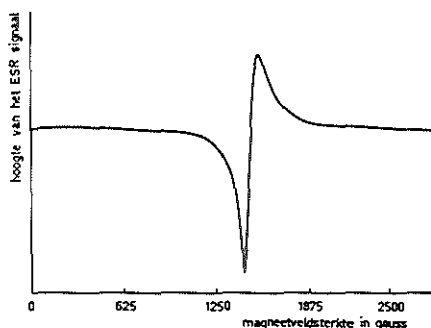


Fig. V-1. Electrons핀resonantie spectrum van ijzer (II) transferrine.

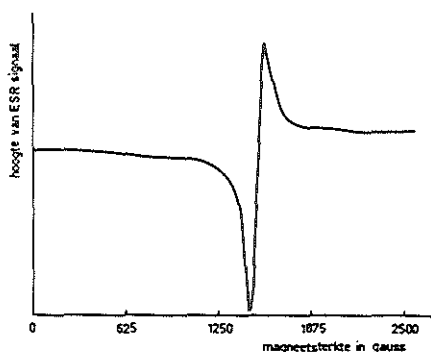


Fig. V-2. Electrons핀resonantie spectrum van ijzer (III) transferrine.

In de figuren V-1 en V-2 zijn twee van dergelijke spectra als voorbeeld weergegeven. Een verschil is in deze spectra niet te zien. De overeenkomst met de resultaten van Aasa e. a.<sup>43)</sup> is ook groot, echter een opsplitsing van het signaal namen wij niet waar.

Zoals werd opgemerkt is het met hulp van de piekhoogte in het E.S.R.-spectrum en enkele gegevens behorende bij het meetsysteem mogelijk het ijzergehalte te berekenen. In tabel V-1 zijn een serie waarnemingen samengevat, waarbij zowel met de E.S.R.-techniek als chemisch de ijzergehalten zijn bepaald.

Tabel V-1

Resultaten van een aantal experimenten, waarbij transferrine met Fe (II) respectievelijk met Fe (III) werd opgeladen.

	transferrinegehalte $\mu\text{mol/g}^*$	ijzergehalte $\mu\text{mol/g}^*$	
		chemisch bepaald	met E.S.R. bepaald
Fe (II)	3,60	7,70	7,15
	5,38	10,70	9,14
	1,60	3,21	1,09
	3,00	0,27	0,32
Fe (III)	3,60	7,70	7,25
	5,24	10,50	9,30
	1,56	3,09	1,10
	0,76	1,54	0,50
	3,00	0,28	0,35

$g^* = \text{gram droge stof}$ . Dit geldt ook voor de hierna volgende tabellen.

Hierbij moet aangetekend worden, dat de fout, die gemaakt wordt bij de bepaling van het ijzergehalte met de E.S.R.-techniek minstens  $4 \times$  zo groot is als de fout die bij een chemische bepaling gemaakt wordt. Bij lage ijzerconcentraties ligt dit nog ongunstiger.

Tevens werd transferrine met diverse hoeveelheden ijzer opgeladen zodat er sprake was van een verzadigingsreeks van het transferrine; dit geschiedde met ijzer in de tweewaardige vorm. In tabel V-2 staan de resultaten van een dergelijke reeks proeven weergegeven.



Tabel V-2

Experimenten met transferrine en opklimmende hoeveelheden ijzer (II).

transferrinegehalte $\mu\text{mol/g}^*$	ijzergehalte $\mu\text{mol/g}^*$	
	chemisch bepaald	met E.S.R. bepaald
12,5	9,8	8,2
12,5	14,5	8,9
12,5	17,7	17,1
12,4	20,8	24,1
12,3	24,1	24,1

Een toenemende verzadiging geeft ook een groter E.S.R.-signaal te zien, zoals uit tabel V-2 is op te merken. De vorm van het signaal verandert niet bij hogere percentages ijzer, zodat het niet waarschijnlijk is dat er een sterke interactie tussen de 2 ijzeratomen bestaat. Dit is in overeenstemming met de resultaten van Aasa e.a.<sup>43)</sup>.

De conclusies die uit deze serie experimenten getrokken kunnen worden zijn:

1. De spectra, opgenomen van de complexen waarbij transferrine met Fe (III) respectievelijk Fe (II) is opgeladen, verschillen niet van elkaar; het ijzer is bij beide als bij ijzer (III) gebonden.
2. Ook bij lagere verzadigingspercentages van transferrine met Fe (II) wordt het ijzer op een zodanige wijze gebonden dat een ijzer (III) signaal in het E.S.R.-spectrum resulteert.
3. Uit het bovenstaande blijkt, dat het opladen van transferrine met ijzer (III) eenzelfde beeld geeft als in de literatuur beschreven door Aasa e.a.<sup>43)</sup> voor hun reactieproduct ontstaan uit transferrine en ijzer (III).

ad b. Voor het opnemen van deze serum-spectra werd gebruik gemaakt van enkele normale sera en van enkele sera van patiënten\*\*, die een verhoogd ijzergehalte hadden. Deze serummonsters moesten uiteraard, voordat zij geschikt waren om metingen uit te voeren, gevriesdroogd worden. In figuur V-3 is het spectrum weergegeven van een van de serummonsters, waarin duidelijk de ijzer-resonantiepiek te zien is, hetgeen dus wil zeggen, dat ijzer als ijzer (III) aanwezig is.

\*\* Onze dank hiervoor gaat uit naar Dr. W.F. Wiltink van de afdeling Interne Geneeskunde I van het Academisch Ziekenhuis Dijkzigt.

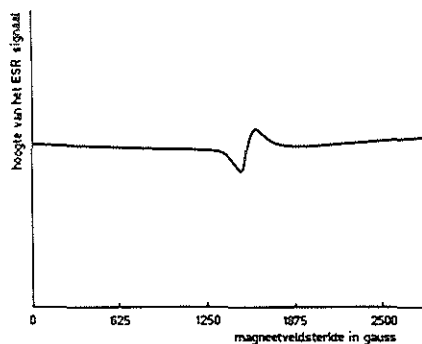


Fig. V-3. Electronspinresonantie spectrum van serum.

In tabel V-3 staan de resultaten van de meting van een aantal sera vermeld. Ook hierbij zijn alle concentraties uitgedrukt per gram droge stof.

Tabel V-3

Experimenten met serum zonder verdere toevoeging.

transferrinegehalte $\mu\text{mol/g}^*$	ijzergehalte $\mu\text{mol/g}^*$	
	chemisch bepaald	met E.S.R. bepaald
0,37	0,38	0,27
0,35	0,23	0,13
0,35	0,26	0,13
0,45	0,59	0,36
0,47	0,68	0,36
0,40	0,68	0,32
0,32	0,57	0,32
0,40	0,63	0,36

Uit deze tabel blijkt, dat een bepaald percentage van het aanwezige serum ijzer bij  $g = 4.3$  niet te detecteren is. Een eenduidige verklaring voor dit feit hebben wij niet kunnen vinden. In de discussie in hoofdstuk VII zal hierop teruggekomen worden.

ad c. Aan serum werden diverse hoeveelheden ijzer (II) en ijzer (III) toegevoegd, zodat diverse verzadigingspercentages werden verkregen. Ook

werden hoeveelheden toegevoegd die zorgden voor meer dan 100% verzadiging van het transferrine.

Ook bij deze experimenten werden de sera gevriesdroogd. In tabel V-4 staan de resultaten van enkele metingen vermeld.

Tabel V-4

Experimenten met serum en extra ijzertoevoegingen.

	transferrinegehalte $\mu\text{mol/g}^*$	ijzergehalte in $\mu\text{mol/g}^*$	
		chemisch bepaald	met E.S.R. bepaald
Fe (II)	0,37	0,38	0,27
	0,39	0,36	0,36
	0,39	0,76	0,53
	0,39	0,82	0,59
	0,38	1,11	0,61
	0,38	1,28	0,64
	0,36	1,74	0,75
	0,37	2,86	0,77
	0,37	4,44	0,89
Fe (III)	0,35	0,23	0,12
	0,35	0,36	0,16
	0,35	0,64	0,34
	0,35	1,04	0,39
	0,35	1,29	0,36
	0,35	1,95	0,41
	0,35	2,84	0,41

Zoals uit tabel V-4 op te merken valt, wordt in serum het Fe (III) slechts voor een gedeelte gebonden. Tevens valt op, dat het transferrine in serum niet met Fe (III) is te verzadigen, ondanks grotere toevoegingen van dit metaal. Bij Fe (II) toevoeging ligt het E.S.R.-signaal veel gunstiger. Ook hier is geen verklaring voor, maar in de discussie zal hierop worden ingegaan. Verderop in dit hoofdstuk zullen de resultaten uit tabel V-4 grafisch worden weergegeven (figuur V-4).

ad d. De experimenten beschreven onder ad c. liggen wat de ijzerconcentratie betreft aan de lage kant, zodat de signalen nog juist gedetecteerd konden worden.

Teneinde de betrouwbaarheid van de kwantitatieve gegevens die verkregen werden uit de E.S.R.-spectra te vergroten, werd de concentratie van transferrine verhoogd.

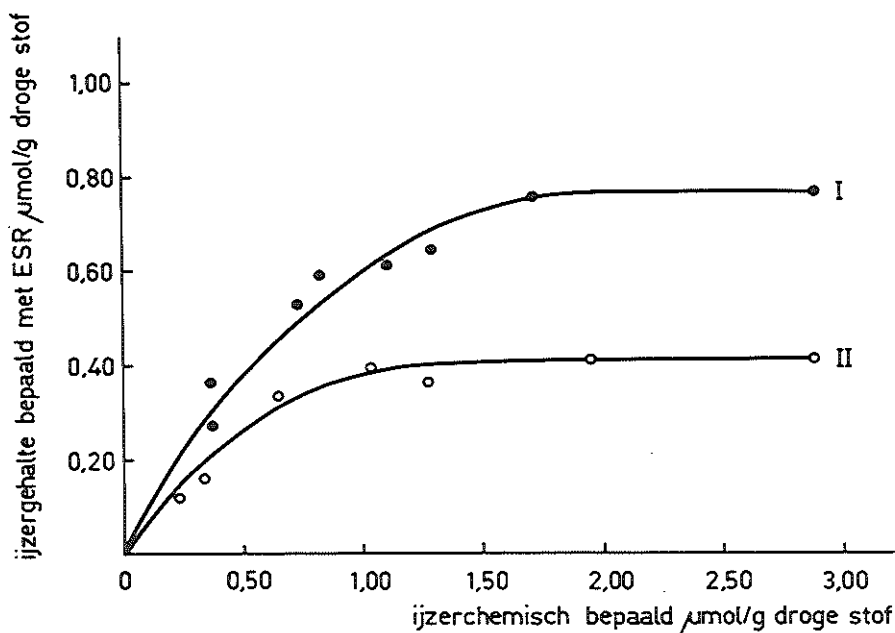


Fig. V-4. Verband tussen ijzergehalten, chemisch bepaald en met E.S.R.-spectra bepaald, met serum zonder extra transferrine toevoeging.

Transferrine-gehalte bij beide series experimenten 0,38  $\mu\text{mol/g}$  droge stof.

Curve I: transferrine in serum opgeladen met Fe (II).

Curve II: transferrine in serum opgeladen met Fe (III).

Ook bij deze experimenten werd ijzer toegevoegd als Fe (II) en Fe (III).

In tabel V-5 staan enkele resultaten van de uitgevoerde experimenten vermeld.

Ook deze resultaten staan grafisch weergegeven in de figuren V-5 en V-6. Uit deze tabel is te zien, dat het toegevoegde ijzer (III) slechts voor een gedeelte wordt gebonden, bij ijzer (II) als toevoeging liggen de signalen en ligt dus de hoeveelheid gebonden ijzer veel hoger.

Tabel V-5

Experimenten met serum waaraan extra transferrine en ijzer (II) respectievelijk ijzer (III) was toegevoegd.

	transferrinegehalte $\mu\text{mol/g}^*$	ijzergehalte in $\mu\text{mol/g}^*$	
		chemisch bepaald	met E.S.R. bepaald
Fe (II)	0,67	0,70	0,43
	0,68	0,87	0,44
	0,68	1,17	0,53
	0,69	1,34	0,84
	0,66	2,38	1,02
	0,67	3,67	1,15
	1,30	0,76	0,35
	1,30	1,02	0,57
	1,28	1,20	0,86
	1,30	1,36	0,89
	1,31	2,66	1,67
	1,29	3,79	1,63
Fe (III)	0,69	0,15	0,089
	0,72	0,40	0,36
	0,70	0,71	0,50
	0,71	0,97	0,56
	0,69	2,15	0,80
	0,70	3,16	0,84
	0,68	3,52	0,90
	1,30	0,67	0,38
	1,31	0,95	0,52
	1,30	1,36	0,70
	1,29	1,68	0,72
	1,29	3,02	0,86
	1,31	4,04	0,87

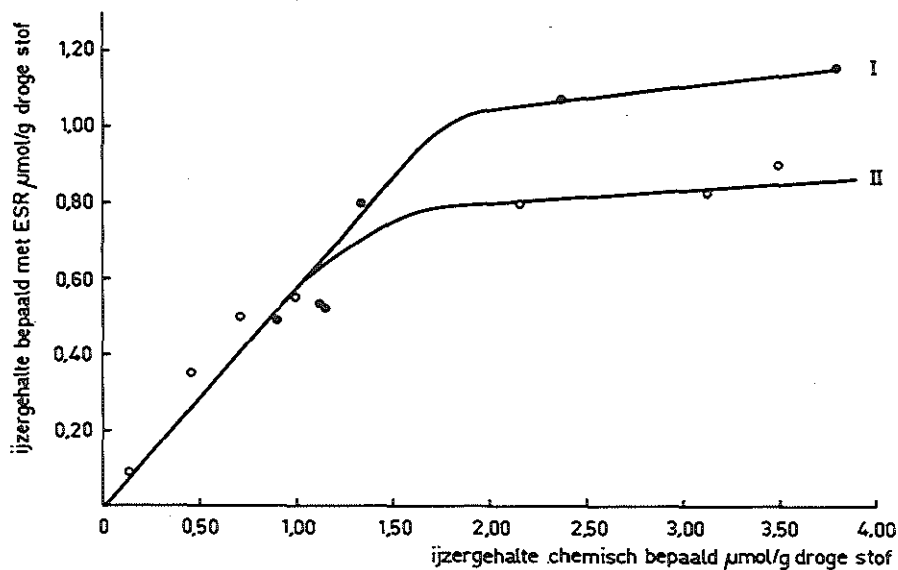


Fig. V-5. Verband tussen de ijzergehalten, chemisch bepaald en met E.S.R.-spectra bepaald, met serum met extra transferrine toevoeging.

Curve I: transferrine in serum (0,68  $\mu\text{mol/g}$  droge stof) opgeladen met Fe (II).

Curve II: transferrine in serum (0,70  $\mu\text{mol/g}$  droge stof) opgeladen met Fe (III).

Tabel V-6

Experimenten met gedialyseerd serum en toevoeging van extra transferrine en ijzer (II) respectievelijk ijzer (III).

	transferrinegehalte $\mu\text{mol/g}^*$	ijzergehalte in $\mu\text{mol/g}^*$	
		chemisch bepaald	met E.S.R. bepaald
Fe (II)	1,18	0,98	0,51
	1,18	1,20	1,15
	1,18	1,72	1,63
Fe (III)	0,50	0,50	0,29
	0,50	0,57	0,36
	0,50	0,93	0,68
	0,50	1,29	0,91
	0,50	1,86	0,98

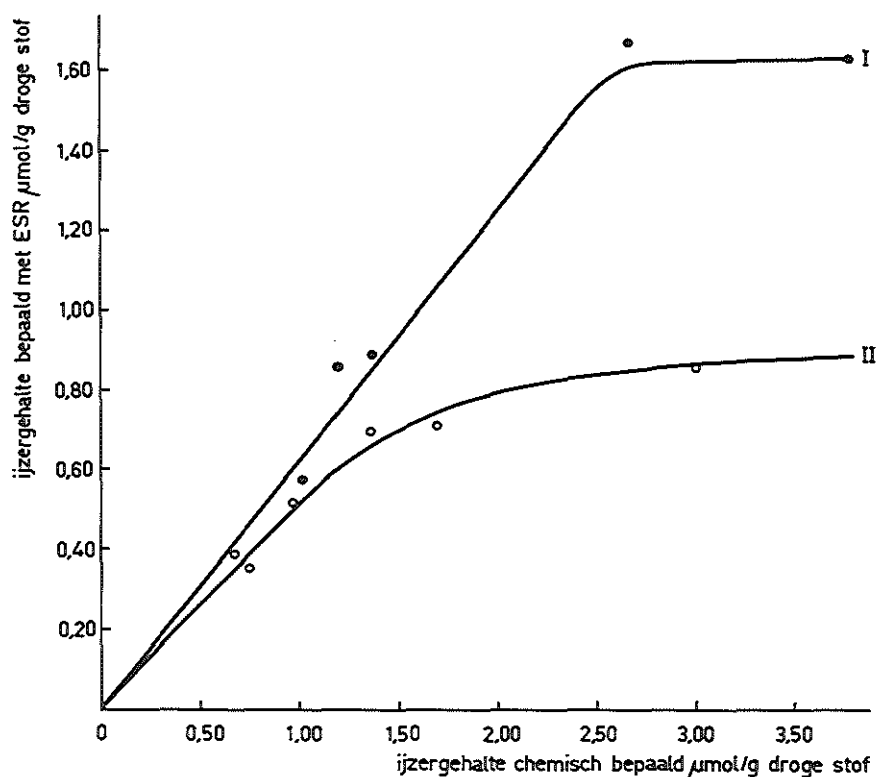


Fig. V-6. Verband tussen de ijzergehalten, chemisch bepaald en met E.S.R. bepaald, met serum met extra transferrine toevoeging.

Curve I: transferrine in serum (1,29  $\mu\text{mol/g}$  droge stof) opgeladen met Fe (II).

Curve II: transferrine in serum (1,30  $\mu\text{mol/g}$  droge stof) opgeladen met Fe (III).

ad e. Met dit serum en de toevoegingen werden slechts enkele experimenten uitgevoerd. Het doel was na te gaan of de spectra verschillen vertoonden wat de ijzer-resonantiepiek betreft met de spectra beschreven onder a t/m d. Dit bleek niet het geval te zijn.

In tabel V-6 staan de resultaten van twee series experimenten vermeld, die met Fe (II) en Fe (III) toevoegingen werden uitgevoerd.

Bij gedialyseerd serum liggen de resonantie-signalen hoger dan bij het niet-gedialyseerd serum. In de discussie zal hierop worden teruggekomen.

Zoals reeds aangegeven, zijn de resultaten van de experimenten met serum en toevoegingen ook grafisch weergegeven, en wel in figuur V-7..

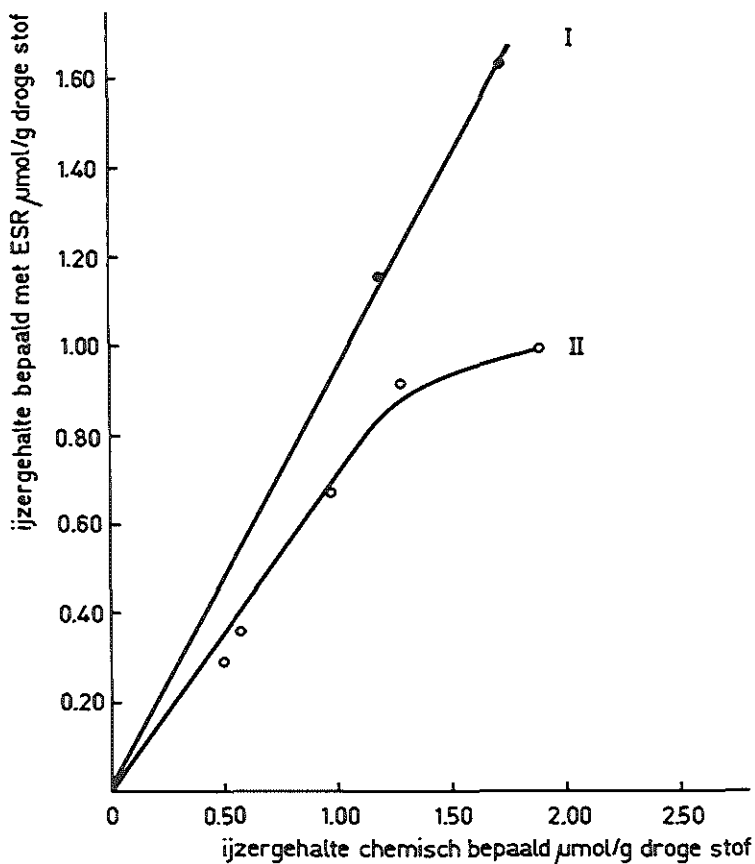


Fig. V-7. Verband tussen de ijzergehalten, chemisch bepaald en met E.S.R. bepaald, met gedialyseerd serum met extra transferrine toevoeging.

Curve I: transferrine in serum ( $1,18 \mu\text{mol/g}$  droge stof) oogeladen met Fe (II).

Curve II: transferrine in serum ( $0,50 \mu\text{mol/g}$  droge stof) oogeladen met Fe (III).

De verschillen in de uitkomsten van de proeven met diverse toevoegingen zijn op die wijze weergegeven zeer goed te onderkennen. In de discussie komen wij ook hierop terug.

## CONCLUSIE

Zoals uit de resultaten van de experimenten met de elektronspinresonantie-spectrometer blijkt is er volgens dit criterium geen verschil te



constateren tussen de complexen ontstaan door oplading met ijzer als Fe (II) en Fe (III).

In het complex geeft het ijzer een E.S.R.-signaal hetgeen wijst op Fe (III). In serum is het ijzer op identieke wijze aanwezig. Serum zonder verdere behandelingen is moeilijk te verzadigen voor 100% met ijzer. Deze gegevens worden door ons verder verwerkt in de discussie.

## HOOFDSTUK VI

### DE BEPALING VAN DE REACTIECONSTANTEN VAN HET TRANSFERRINE-IJZER SYSTEEM

#### INLEIDING

De experimenten die in de voorgaande hoofdstukken beschreven werden, waren uitgevoerd met het transferrine-ijzer systeem in de evenwichtstoestand. Voor de berekeningen van de evenwichtsconstanten speelde de tijdsfactor geen rol. Alleen werd nagegaan, zoals vermeld, of het systeem inderdaad de evenwichtstoestand had bereikt.

Het leek ons wenselijk te proberen een proefopzet te ontwikkelen waarmee de vormingssnelheid van het transferrine-ijzer complex in de tijd te volgen was. Immers, wanneer wij hiertoe in staat zouden zijn, zouden wij wellicht de reactieconstanten kunnen berekenen. En daardoor zouden wij langs een geheel andere weg dan in de vorige hoofdstukken beschreven een indruk kunnen krijgen omtrent de evenwichtsconstanten. Dit berust op het feit, dat de evenwichtsconstanten per definitie gelijk zijn aan de quotiënten van de respectievelijke reactieconstanten.

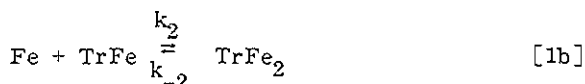
Ook bij dit onderdeel van de experimenten wilden wij zoveel mogelijk dezelfde omstandigheden aanhouden als bij de dialyse-experimenten. Het is echter niet mogelijk van dialyse-proeven gebruik te maken voor ons doel, aangezien, zoals reeds vermeld, hiervoor de proefopzet nogal ingewikkeld is. Meerdere factoren, zoals bijvoorbeeld diffusiesnelheid en membraan-doorlaatbaarheid, hebben ook invloed op de kinetiek. Gezocht werd derhalve naar een andere opstelling. Wij kozen voor een proefopzet, die op het

principe van de optische meting berust.

Bij de bespreking van de optische experimenten in hoofdstuk IV werd gesteld, dat de grootte van de extinctie bij 470 nm van een oplossing van transferrine en ijzer een maat is voor de concentratie van het metaal-eiwit complex. Het leek ons dan ook de aangewezen manier om langs optische weg de vorming van het complex in de tijd te volgen.

Zoals reeds vermeld in het literatuuroverzicht, is deze methode door Ross en medewerkers<sup>42)</sup> ook gebruikt bij hun kinetische experimenten. Zij gingen ervan uit, dat de reactie tussen transferrine en ijzer een ééntraps-reactie was en slechts in één richting verliep. In plaats van met vier reactieconstanten karakteriseren zij het systeem met één reactieconstante. Ook werd in het literatuuroverzicht melding gemaakt van het feit, dat Woodworth<sup>55)</sup> eveneens een ééntrapsreactie aanneemt bij zijn reactiesnelheidsmetingen. Tevens wordt ook door hem de reactieconstante van de dissociatiereactie verwaarloosbaar klein verondersteld.

Wij wilden de reactieconstanten proberen te berekenen voor het systeem, zoals wij dit steeds beschreven hebben. Dus:



Hierin stellen  $k_1$ ,  $k_{-1}$ ,  $k_2$ ,  $k_{-2}$  de vier reactieconstanten voor, die bij het systeem behoren en die wij wilden bepalen. Voor de verandering van de concentratie van het niet-gebonden ijzer in de tijd geldt:

$$\frac{d[\text{Fe}]}{dt} = -k_1[\text{Fe}][\text{Tr}] + k_{-1}[\text{TrFe}] - k_2[\text{TrFe}][\text{Fe}] + k_{-2}[\text{TrFe}_2] \quad [a]$$

Voor de verandering van de transferrine-concentratie in de tijd geldt:

$$\frac{d[\text{Tr}]}{dt} = -k_1[\text{Fe}][\text{Tr}] + k_{-1}[\text{TrFe}] \quad [b]$$

Op elk moment geldt:

$$[\text{Tr}_0] = [\text{Tr}] + [\text{TrFe}] + [\text{TrFe}_2] \quad [5]$$

$$[\text{Fe}_0] = [\text{Fe}] + [\text{TrFe}] + 2[\text{TrFe}_2] \quad [6]$$

[5] betreft de ijzerbalans en [6] de transferrinebalans.

Uit [5] en [6] volgt:

$$[\text{TrFe}] = -2[\text{Tr}] + [\text{Fe}] + 2[\text{Tr}_0] - [\text{Fe}_0] \quad [7]$$

$$[\text{TrFe}_2] = [\text{Fe}_0] - [\text{Fe}] - [\text{Tr}_0] + [\text{Tr}] \quad [8]$$

[7] en [8] ingevuld in [a] en [b] geeft:

$$\begin{aligned} \frac{d[\text{Fe}]}{dt} = & -k_1 [\text{Tr}][\text{Fe}] + k_{-1} \{-2[\text{Tr}] + [\text{Fe}] + 2[\text{Tr}_0] - [\text{Fe}_0]\} - \\ & - k_2 [\text{Fe}] \times \{-2[\text{Tr}] + [\text{Fe}] + 2[\text{Tr}_0] - [\text{Fe}_0]\} + \\ & + k_{-2} \{[\text{Fe}_0] - [\text{Fe}] - [\text{Tr}_0] + [\text{Tr}]\} \end{aligned} \quad [c]$$

$$\frac{d[\text{Tr}]}{dt} = -k_1 [\text{Fe}][\text{Tr}] + k_{-1} \{-2[\text{Tr}] + [\text{Fe}] + 2[\text{Tr}_0] - [\text{Fe}_0]\} \quad [d]$$

[c] en [d] geven dus de verandering in de tijd weer van de concentraties van het niet-gebonden ijzer en het transferrine. Deze differentiaalvergelijkingen zijn van het type

$$y' = f(x, y, z) \text{ en } z' = g(x, y, z),$$

waarin y een functie is van x en z ook een functie van x is.

Dergelijke differentiaalvergelijkingen zijn numeriek goed oplosbaar, via de bekende rekenmethode van Runge-Kutta<sup>71)</sup>.

Wij kozen deze rekenmethode uit om het verloop van de extinctie in de tijd op grond van de vergelijkingen vast te leggen. Dit heeft de volgende redenen.

Voor ieder tijdstip kunnen [Fe] en [Tr] worden berekend, indien [Fe]<sub>0</sub> en [Tr]<sub>0</sub> bekend zijn. In onze proefopzet zal [Fe]<sub>0</sub> zowel de beginconcentratie op tijdstip x = 0 van het niet-gebonden ijzer weergeven, als de totaalconcentratie van ijzer op ieder ander tijdstip. Ditzelfde geldt voor transferrine.

Met behulp van de berekende concentraties [Fe] en [Tr] kan voor dat bepaalde tijdstip ook [TrFe] en [TrFe<sub>2</sub>] worden berekend op grond van [7] en [8]. Dit geeft weer de mogelijkheid, gebruik makend van vergelijking [19] uit hoofdstuk IV luidende:

$$E_{470} = \epsilon_1 [\text{TrFe}] + \epsilon_2 [\text{TrFe}_2] \quad [19]$$

de extinctie op ieder tijdstip uit te rekenen.

Uitgangspunt van dit berekende verloop van de extinctie is de aanname van een viertal reactieconstanten  $k_1$ ,  $k_{-1}$ ,  $k_2$ ,  $k_{-2}$ . Met deze methode kan dus voor één serie van een viertal waarden van de reactieconstanten  $k_1$ ,  $k_{-1}$ ,  $k_2$  en  $k_{-2}$ , het snelheidsverloop van de reactie tussen transferrine en ijzer bepaald worden.

Uiteraard kan het op deze wijze berekende verloop van de extinctie in de tijd, wanneer bijeengevoegd worden transferrine en ijzer met als concentraties  $[Fe_O]$  en  $[Tr_O]$ , vergeleken worden met een experimenteel gevonden curve.

Uit dit vergelijken zal volgen of de serie waarden voor  $k_1$ ,  $k_{-1}$ ,  $k_2$  en  $k_{-2}$ , op grond waarvan de berekening is uitgevoerd, juist is. Door nu steeds opnieuw op grond van het vergelijken van het berekende en het experimenteel bepaalde extinctieverloop series waarden voor de vier reactieconstanten als grondslag voor een nieuwe berekening te gebruiken, kunnen de waarden van  $k_1$ ,  $k_{-1}$ ,  $k_2$  en  $k_{-2}$  goed benaderd worden. Deze simulatietechniek vereist zoveel rekenwerk, dat de inschakeling van een computer noodzakelijk is. Er is dan ook door ons een computerprogramma voor dit doel geschreven. Bijzonderheden hieromtrent zijn in hoofdstuk II opgenomen.

De experimentele bepaling van het extinctieverloop in de tijd geschiedde bij diverse transferrine- en ijzer-beginconcentraties. Het simuleren vond uiteraard plaats met dezelfde concentraties van beide componenten. Op deze wijze kon verwacht worden dat een goed inzicht in de orde van grootte van de vier reactieconstanten zou kunnen worden verkregen.

Zoals in de beschrijving van de ontwikkeling van de proefopzet zal blijken, zijn de reactiesnelheden van het ijzertransferrine systeem dermate groot, dat het volgen van de kinetiek in de begintijd van de reactie bijzondere problemen geeft met betrekking tot de registratie. Op ons laboratorium kon, zoals wij moesten vaststellen, met de ter beschikking staande apparatuur slechts bij benadering de reactiesnelheid worden vervolgd.

In de literatuur staan methoden voor de reactiesnelheidsmeting beschreven voor snelle reacties met behulp van de "stopped flow"-techniek<sup>72)</sup>. Deze berust erop dat de twee componenten van het systeem zeer snel worden gemengd, waarna de extinctie-veranderingen met behulp van een oscilloscoop worden geregistreerd. Een gedeelte van onze snelheidsmetingen hebben wij kunnen uitvoeren met deze techniek. Dit werd ons mogelijk gemaakt door Prof. Dr. C. Veeger, die het apparaat aanwezig op het laboratorium voor Biochemie van de Landbouw Hogeschool te Wageningen wel-

willend ter beschikking stelde. Ir. J. Pronk instrueerde ons in het gebruik van het instrument.

Zoals gesteld, was het onze bedoeling na te gaan of door de bepaling van  $k_1$ ,  $k_{-1}$ ,  $k_2$  en  $k_{-2}$  inzicht zou kunnen worden verkregen, langs een geheel andere weg dan in de hoofdstukken III en IV, in de grootte van de evenwichtsconstante:  $K_1 = \frac{k_1}{k_{-1}}$  en  $K_2 = \frac{k_2}{k_{-2}}$ . Wij maakten evenals dit in hoofd-

stuk V geschiedde, van de gelegenheid, die de ter beschikking staande apparatuur bood, gebruik ook nog enig onderzoek te verrichten over een enkel voor onze proefopzet belangwekkend vraagpunt. Zo gingen wij na wat de invloed van bicarbonaat op het extinctieverloop was.

## ONTWIKKELING VAN DE PROEFOPZET

In de inleiding is reeds vermeld, dat de experimenten in twee gedeelten uiteen vallen, te weten de proeven die in het eigen laboratorium zijn verricht en die welke in Wageningen zijn uitgevoerd met de "stopped-flow" methode.

Bij de eerstgenoemde experimenten werd steeds uitgegaan van een oplossing, die bestond uit 25-500  $\mu\text{mol/l}$  transferrine in een 0,05 molaire fosfaatbuffer pH 7,4, waaraan NaCl was toegevoegd (0,155 mol/l) en ascorbinezuur (3 mmol/l). Aan deze oplossing werd afhankelijk van de aard van het experiment dat werd uitgevoerd, bicarbonaat (25 mmol/l) toegevoegd. De experimenten werden uitgevoerd met ijzer (II)-oplossingen van een zodanige concentratie, dat maximaal 0,1 ml toegevoegd diende te worden aan 1 ml van de transferrine-oplossing om de gewenste eindconcentratie aan ijzer (10-1000  $\mu\text{mol/l}$ ) te verkrijgen. Op deze wijze bleef de pH van het reactiemengsel op 7,4, hetgeen bij elk experiment gecontroleerd werd.

De werkwijze was aldus:

In een micro-cuvet (optische weglengte 1 cm) werd 1 ml van de transferrine-oplossing gebracht met de eventuele toevoeging. Hieraan werd de ijzer-oplossing toegevoegd. De beide oplossingen werden door schudden van de cuvet gemengd, waarna de cuvet in een Zeiss spectrofotometer werd gebracht die ingesteld was om de extinctie bij 470 nm te meten. In de blancocuvet was aanvankelijk een bufferoplossing aanwezig. In latere proeven werd deze vervangen door een oplossing van transferrine, die dezelfde concentratie aan dit eiwit had als de meetcuvet.

Met behulp van een stop-watch werd de tijd gemeten, die verstreken was vanaf het moment van mengen. Op bepaalde tijdstippen werd de extinctie afgelezen en genoteerd, waarna de grafische weergave van de verandering van de extinctie met de tijd mogelijk was.

Een resultaat zoals wij dit met de beschreven techniek verkregen, is weergegeven in figuur VI-1. Duidelijk blijkt, dat wij op deze wijze slechts een matige benadering van het extinctie-verloop kunnen verkrijgen. De snelheid van de reactie is weliswaar niet van de orde van grootte als de reactiesnelheden van enzymatische omzettingen. Het voor ons belangwekkende meetgebied ligt in de orde van een tiental seconden, bij de metingen van reactieconstanten van enzymatische omzettingen is een veel kleiner tijdsverloop aan de orde. Toch was de snelheid voor nauwkeurige metingen te groot voor onze apparatuur.

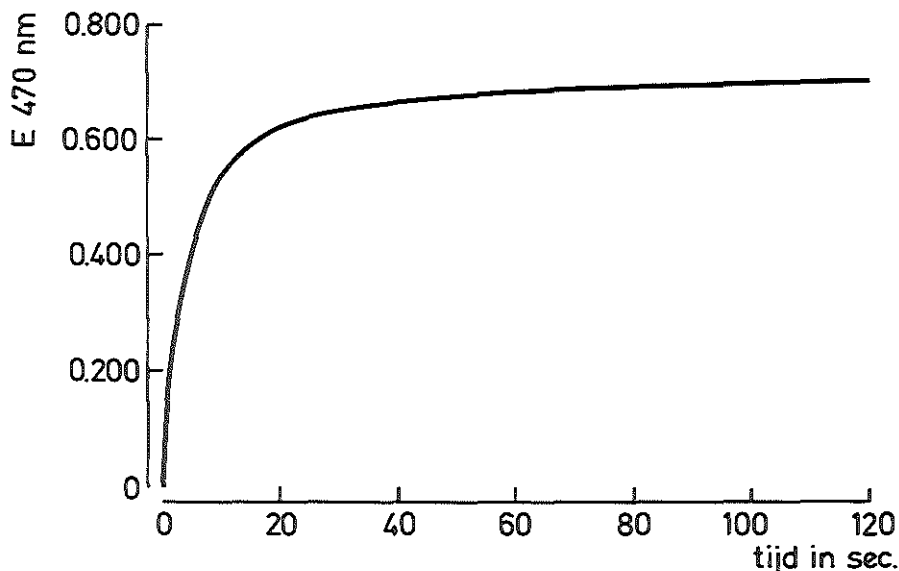


Fig. VI-1. Verband tussen de extinctie bij 470 nm en de tijd bij bijeenvoegen van transferrine en ijzer (II) met extra bicarbonaat toevoeging (25 mmol/l).  
Transferrine-concentratie = 235  $\mu$ mol/l.  
Ijzer(II)-concentratie = 450  $\mu$ mol/l.

Daar in eerste instantie ons geen apparaat voor een "stopped-flow" techniek ter beschikking stond, besloten wij desondanks een aantal onderzoeken te doen. Wij realiseerden ons dat deze slechts een oriënterend karakter

zouden kunnen dragen.

Voor de experimenten met de "stopped-flow" techniek bleek de bovenbeschreven proefopzet niet bruikbaar. Bij deze techniek worden twee oplossingen gemengd en wel in gelijke volumina. Dit is een essentieel onderdeel met het oog op de noodzakelijke zeer snelle menging en daar is dus geen afwijking van mogelijk. Voor de ene component kozen wij een oplossing van transferrine in diverse concentraties in 0,1 molaire fosfaatbuffer (pH 7,4) waaraan NaCl was toegevoegd met een concentratie van 0,31 mol/l. Aan deze component werd, indien noodzakelijk, bicarbonaat en ascorbinezuur toegevoegd en wel 50 mmol/l, respectievelijk 6 mmol/l. De andere component bestond uit een ijzer-oplossing in aqua bidest., bevattende 15-1000  $\mu$ mol/l. Deze werd met NaOH op pH 5,5 gebracht. Alle concentraties werden dus zodanig gekozen, dat de eindconcentraties na menging overeen zouden komen met de concentraties die in onze experimenten gebruikelijk zijn.

Bij alle experimenten die uitgevoerd zijn bij het onderzoek om de reactiesnelheid te bepalen, is ook de extinctie bij 470 nm gemeten na 24 uur.

Wij moesten vaststellen dat met de "stopped-flow" methode geen metingen met Fe (III) konden worden gedaan bij de door ons genoemde concentraties. Daarvoor zijn twee oorzaken aan te wijzen. De gele kleur van de oplossingen stoorde sterk. Fe (III) oplossingen gaven bij pH 5,5 een sterke hydrolyse zodat een lagere pH moest worden gekozen en deze werd na menging met de transferrine-oplossing niet constant bij 7,4. Voor technische bijzonderheden omtrent de gekozen proefopzet wordt verwezen naar hoofdstuk II.

## ORIENTERENDE METINGEN BETREFFENDE DE REACTIESNELHEID VAN HET TRANSFERRINE-IJZER SYSTEEM

Deze metingen zijn als volgt in te delen:

- a. experimenten met transferrine en ijzer (II)
- b. experimenten met transferrine, ijzer (II) en bicarbonaat
- c. experimenten met transferrine en ijzer (III)
- d. experimenten met transferrine, ijzer (III) en bicarbonaat
- e. experimenten met transferrine en ijzer (III) waarbij aan het mengsel na enkele minuten vanaf het begin een reductans werd toegevoegd.



ad a. In figuur VI-2 staan de resultaten van een aantal experimenten weer-gegeven die verricht zijn met verschillende concentraties aan transferrine en ijzer (II). De bicarbonaatconcentratie kan op grond van overwegingen die in hoofdstuk III worden behandeld, worden geschat op 0,3 mmol/l.

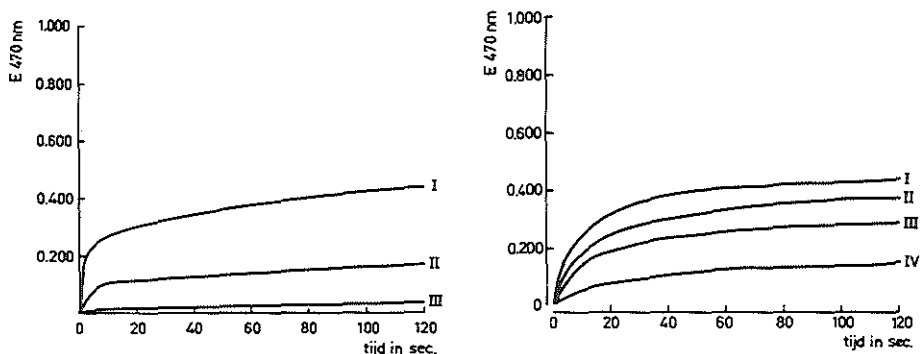


Fig. VI-2. Verband tussen de extinctie bij 470 nm en de tijd bij bijeenvoeging van ijzer (II) en transferrine zonder extra bicarbonaat toevoeging.

Gebruikt werden respectievelijk de volgende concentraties:

Curve I : 450 $\mu$ mol Tr + 900 $\mu$ mol Fe(II)/l	Curve I : 900 $\mu$ mol Tr + 450 $\mu$ mol Fe(II)/l
Curve II : 225 $\mu$ mol Tr + 450 $\mu$ mol Fe(II)/l	Curve II : 450 $\mu$ mol Tr + 450 $\mu$ mol Fe(II)/l
Curve III: 112 $\mu$ mol Tr + 220 $\mu$ mol Fe(II)/l	Curve III: 225 $\mu$ mol Tr + 450 $\mu$ mol Fe(II)/l
	Curve IV: 112 $\mu$ mol Tr + 450 $\mu$ mol Fe(II)/l

ad b. Ook de resultaten van deze experimenten zijn in grafiekvorm weer-gegeven en wel in figuur VI-3. Bij deze proeven zijn zoveel mogelijk dezelfde concentraties aan transferrine en ijzer (II) aangehouden als bij de proeven zonder extra bicarbonaat toevoeging.

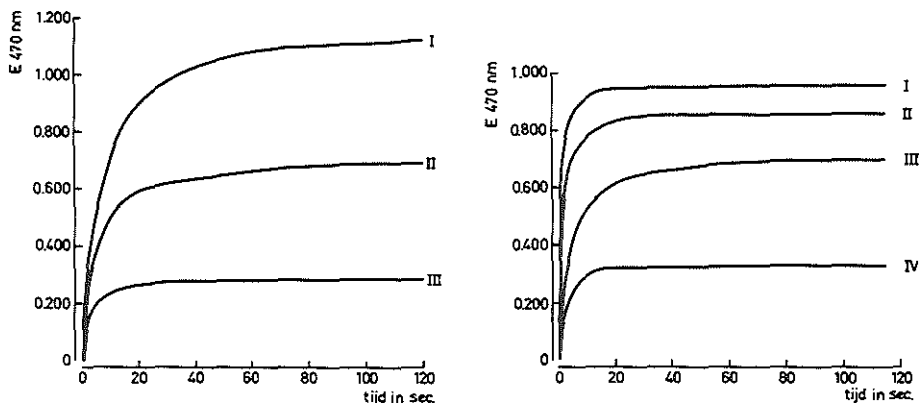


Fig. VI-3. Verband tussen de extinctie bij 470 nm en de tijd bij bijeenvoeging van ijzer (II) en transferrine met extra bicarbonaat toevoeging (25 mmol/l).

Voor de gebruikte concentraties zie fig. VI-2.

ad c. Figuur VI-4 toont de resultaten van de experimenten waarbij aan transferrine ijzer (III) werd toegevoegd.

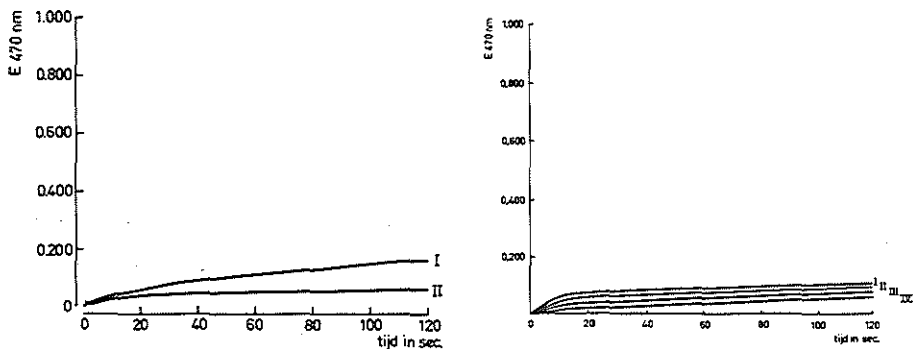


Fig. VI-4. Verband tussen de extinctie bij 470 nm en de tijd bij bijeenvoeging van ijzer (III) en transferrine zonder extra bicarbonaat toevoeging.  
 Voor de gebruikte concentraties, zie fig. VI-2, echter nu met ijzer (III) in plaats van ijzer (II).

ad d. De experimenten die bij dit onderdeel zijn uitgevoerd, resulteerden in curves die in figuur VI-5 zijn weergegeven.

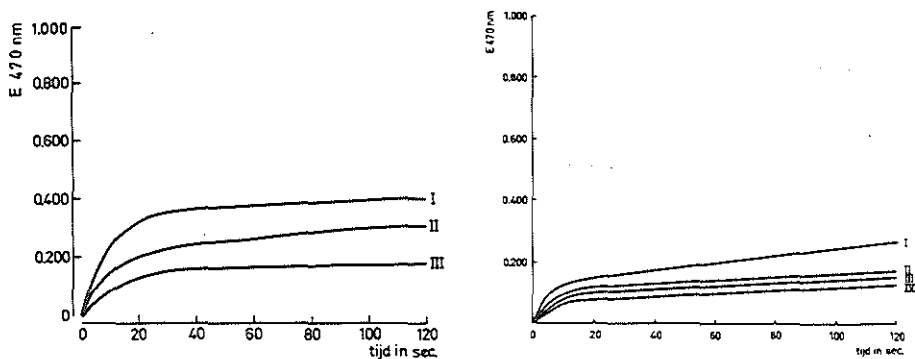


Fig. VI-5. Verband tussen de extinctie bij 470 nm en de tijd bij bijeenvoeging van transferrine en ijzer (III) met extra bicarbonaat toevoeging (25 mmol/l).  
 Voor de gebruikte concentraties, zie fig. VI-4.

ad e. In figuur VI-6 is het extinctie-verloop weergegeven van enkele experimenten, die als controleproeven dienden van de resultaten van de vier hierboven beschreven groepen. \*

Curve I stelt hierbij voor het verloop van de extinctie van een transferrine-ijzer mengsel waarbij aan 500  $\mu$ mol transferrine 1000  $\mu$ mol ijzer (II) werd toegevoegd, gerekend per liter. De bicarbonaatconcentratie bedroeg 25 mmol/l.

Curve II geeft weer het reactieverloop van een transferrine-ijzer (III) mengsel, waarbij de concentraties dezelfde waren als onder curve I vermeld. Ook de bicarbonaatconcentratie was dezelfde. Op tijdstip  $t = 0$  is aan dit mengsel ascorbinezuur toegevoegd (3 mmol/l).

Curve III toont het verloop van een reactiemengsel als bij curve II beschreven. Echter bij dit experiment werd pas na 2,5 minuut het ascorbinezuur toegevoegd.

Curve IV laat het verloop zien van een transferrine-ijzer (III) mengsel, wederom met dezelfde concentraties aan eiwit, ijzer en bicarbonaat waarbij geen ascorbinezuur werd toegevoegd. Opgemerkt dient bij dit onderdeel te worden dat op de tijdas van deze grafiek voor de tijdeenheid een minuut werd gekozen en niet zoals onder ad a. t/m ad d. de seconde.

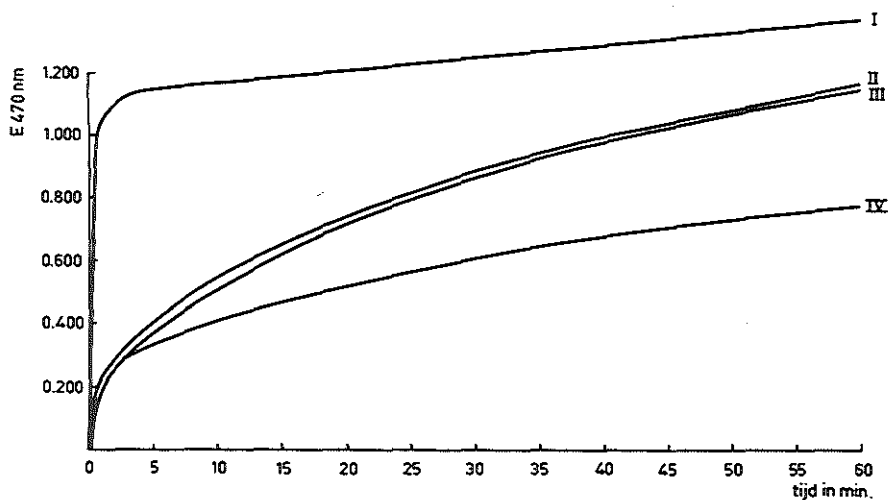


Fig. VI-6. Verband tussen de extinctie bij 470 nm en de tijd bij bijeenvoeging van transferrine en ijzer. Zie voor verklaring de tekst.

De waarden van de extincties van alle monsters na 24 uur staan vermeld in tabel VI-1.

Tabel VI-1

Waarden van de extincties bij 470 nm gemeten na 24 uur, behorende bij de figuren VI-2 t/m VI-10.

Concentratie transferrine $\mu\text{mol/l}$	Concentratie ijzer $\mu\text{mol/l}$	$E_{470}$ na 24 uur	Concentratie bicarbonaat $\text{mmol/l}$	
450	900	1,850	-	Ijzer (II)
225	450	0,930	-	
112	225	0,460	-	
900	450	1,030	-	
450	450	1,062	-	
225	450	0,960	-	
112	450	0,630	-	
450	900	1,900	25	
225	450	0,920	25	
125	225	0,505	25	
900	450	1,040	25	
450	450	1,042	25	
225	450	0,980	25	
112	450	0,630	25	
450	900	1,800	-	Ijzer (III)
225	450	0,900	-	
900	450	1,030	-	
450	450	0,980	-	
225	450	0,875	-	
112	450	0,580	-	
450	900	1,800	25	
225	450	0,900	25	
112	225	0,516	25	
900	450	1,010	25	
450	450	1,040	25	
225	450	0,810	25	
112	450	0,562	25	
500	1000	2,260	25	curve I, fig. VI-10.
500	1000	2,230	25	curve II, fig. VI-10.
500	1000	2,230	25	curve III, fig. VI-10.
500	1000	1,760	25	curve IV, fig. VI-10.

Uit deze oriënterende metingen trokken wij de volgende conclusies:

1. Fe (II) reageert veel sneller met transferrine dan Fe (III).
2. De toevoeging van bicarbonaat heeft een sterk versnellende werking op de vorming van het ijzertransferrine complex, zowel bij Fe (II) als bij Fe (III).
3. Toevoeging van vitamine C versnelt de reactie tussen Fe (III) en transferrine; ongetwijfeld doordat Fe (III) wordt omgezet in Fe (II).

4. De reactie tussen Fe (III) en transferrine leidt in het algemeen tot eenzelfde eindextinctie na 24 uur als de reactie tussen dezelfde concentraties Fe (II) en transferrine.
5. Een ruwe berekening van  $k_1$  op grond van het extinctieverloop in de eerste seconden leidt tot een waarde tussen  $1 \times 10^2$  en  $1 \times 10^3$  voor de reactie transferrine met Fe (II) in aanwezigheid van 25 mmol  $\text{HCO}_3^-/\text{l}$ . In "afwezigheid" van bicarbonaat is  $k_1$  ongeveer de helft van deze waarde.
6. Wordt de reactie beschouwd, zoals Ross en medewerkers<sup>42)</sup> dit deden, als een irreversibele ééntrapsreactie, dan volgt voor de waarde van  $k$  495 mol/l/sec voor de reactie tussen transferrine en Fe (II) in aanwezigheid van 25 mmol  $\text{HCO}_3^-/\text{l}$ . In "afwezigheid" van bicarbonaat is de berekende  $k$  gelijk aan 100 mol/l/sec.
7. Dat het opvallend veel tijd kost, nadat in enkele tientallen seconden de snelle fase van de reactie is verlopen, voordat de evenwichtstoestand wordt bereikt.

#### METINGEN MET DE STOPPED-FLOW TECHNIEK VAN DE REACTIE-SNELHEID VAN HET TRANSFERRINE-IJZER SYSTEEM

Deze experimenten zijn als volgt in te delen:

- a. experimenten met transferrine en ijzer (II)
- b. experimenten met transferrine, ijzer (II) en ascorbinezuur
- c. experimenten met transferrine, ijzer (II), ascorbinezuur en bicarbonaat.

ad a. Deze experimenten werden uitgevoerd met een transferrine-concentratie gelijk aan 125  $\mu\text{mol/l}$  en 6 verschillende ijzerconcentraties wisselend van 75 tot 355  $\mu\text{mol/l}$ . De resultaten zijn weergegeven in figuur VI-7.

ad b. De concentraties van transferrine en ijzer bij deze experimenten zijn identiek aan die, welke bij ad a. werden vermeld. De resultaten van deze groep experimenten zijn weergegeven in figuur VI-8.

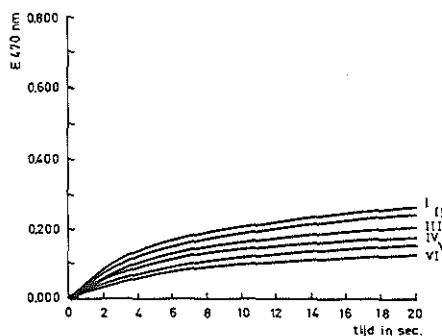


Fig. VI-7. Verband tussen de extinctie bij 470 nm en de tijd bij bijeenvoeging van transferrine en ijzer (II) zonder extra bicarbonaat toevoeging. Gemeten met de "stopped-flow" spectrofotometer. Geen ascorbinezuur toevoeging. Transferrine-concentratie bedroeg  $125 \mu\text{mol/l}$ .  
 Curve I : ijzer(II)-concentratie  $355 \mu\text{mol/l}$ .  
 Curve II : ijzer(II)-concentratie  $270 \mu\text{mol/l}$ .  
 Curve III : ijzer(II)-concentratie  $180 \mu\text{mol/l}$ .  
 Curve IV : ijzer(II)-concentratie  $140 \mu\text{mol/l}$ .  
 Curve V : ijzer(II)-concentratie  $115 \mu\text{mol/l}$ .  
 Curve VI : ijzer(II)-concentratie  $70 \mu\text{mol/l}$ .

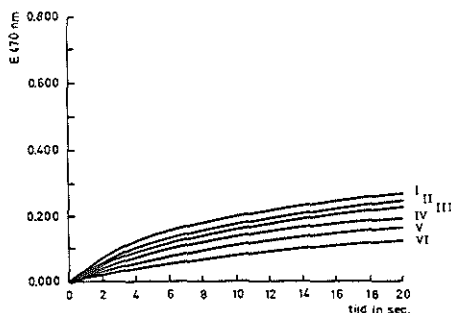


Fig. VI-8. Zelfde omstandigheden als bij fig. VI-7, echter met ascorbinezuur toevoeging ( $3 \text{ mmol/l}$ ).

ad c. Deze experimenten werden uitgevoerd met diverse transferrine-concentraties variërende van  $45$  tot  $125 \mu\text{mol/l}$  en wisselende ijzerconcentraties te weten van  $35$  tot  $355 \mu\text{mol/l}$ . De resultaten zijn weergegeven in de figuren VI-9, 10 en 11.

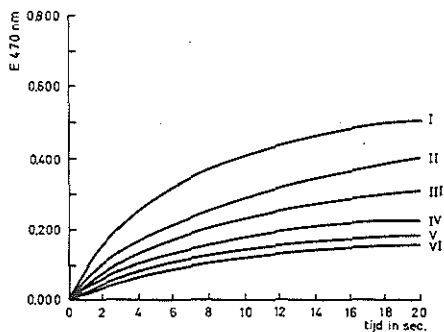


Fig. VI-9. Verband tussen de extinctie bij 470 nm en de tijd bij bijeenvoeging van transferrine en ijzer (II) met extra bicarbonaat toevoeging (25 mmol/l). Gemeten met de "stopped-flow" spectrofotometer.

Transferrine-concentratie bedroeg 125  $\mu\text{mol/l}$ .

Curve I : ijzer(II)-concentratie 355  $\mu\text{mol/l}$ .

Curve II : ijzer(II)-concentratie 270  $\mu\text{mol/l}$ .

Curve III: ijzer(II)-concentratie 190  $\mu\text{mol/l}$ .

Curve IV: ijzer(II)-concentratie 135  $\mu\text{mol/l}$ .

Curve V : ijzer(II)-concentratie 105  $\mu\text{mol/l}$ .

Curve VI: ijzer(II)-concentratie 75  $\mu\text{mol/l}$ .

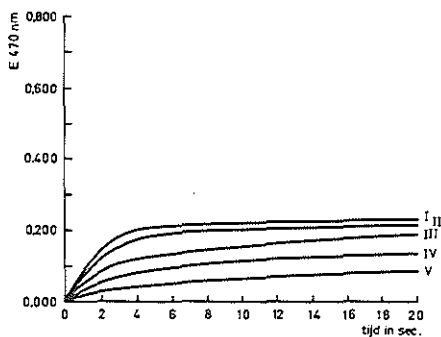


Fig. VI-10. Zelfde omstandigheden als bij fig. VI-9.

Transferrine-concentratie bedroeg 85  $\mu\text{mol/l}$ .

Curve I : ijzer(II)-concentratie 355  $\mu\text{mol/l}$ .

Curve II : ijzer(II)-concentratie 270  $\mu\text{mol/l}$ .

Curve III: ijzer(II)-concentratie 180  $\mu\text{mol/l}$ .

Curve IV: ijzer(II)-concentratie 135  $\mu\text{mol/l}$ .

Curve V : ijzer(II)-concentratie 105  $\mu\text{mol/l}$ .

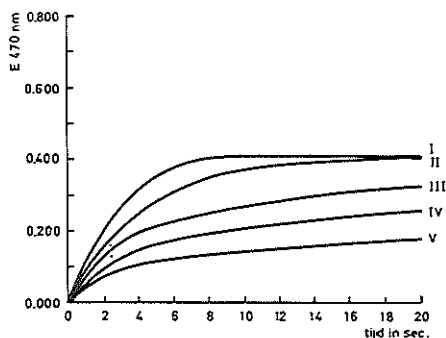


Fig. VI-11. Zelfde omstandigheden als bij fig. VI-9.

Transferrine-concentratie bedroeg 45  $\mu\text{mol/l}$ .

Curve I : ijzer(II)-concentratie 175  $\mu\text{mol/l}$ .

Curve II : ijzer(II)-concentratie 130  $\mu\text{mol/l}$ .

Curve III: ijzer(II)-concentratie 105  $\mu\text{mol/l}$ .

Curve IV: ijzer(II)-concentratie 70  $\mu\text{mol/l}$ .

Curve V : ijzer(II)-concentratie 35  $\mu\text{mol/l}$ .

## UITKOMSTEN VAN DE SIMULATIE-EXPERIMENTEN

Uit de figuren VI-7 en 8 blijkt dat de invloed van ascorbinezuur op de reactiesnelheid nihil is. Derhalve werden voor de systemen met en zonder deze stof geen aparte berekeningen uitgevoerd.

### Experimenten met extra bicarbonaat toevoeging

Uitgangspunten bij de simulatie-proeven waren:

- Ruwe berekeningen op grond van de respectievelijk oriënterende proeven en de experimenten met de "stopped-flow" techniek leerden ons dat  $k_1$  een orde van grootte heeft van  $10^2 - 10^3$ .
- De waarden van  $k_{-1}$ ,  $k_2$  en  $k_{-2}$  werden in eerste instantie afgeleid uit de overweging dat voor  $K_1$  een gemiddelde waarde gevonden was gelijk aan  $0,3 \times 10^6$  en voor  $K_2$   $0,5 \times 10^5$ .
- Wanneer slechts de statistische kans meetelt, moet gelden  $k_1 = 2k_2$  en  $k_{-1} = \frac{1}{2}k_{-2}$ .

Onze werkwijze was aldus:

De orde van grootte van  $k_1$  werd bekeken met simulatie-experimenten door na te gaan welke curves ontstaan, wanneer bij een transferrine-



concentratie van  $125 \mu\text{mol/l}$  en een ijzerconcentratie van  $190 \mu\text{mol/l}$  diverse reeksen reactieconstanten werden ingevoerd. Voor  $k_1$  werd gekozen de waarde van  $0,5 \times 10^2$  tot  $0,1 \times 10^5$ , de waarden van de overige drie constanten volgen uit de uitgangspunten b en c. De curves werden vergeleken met de experimenteel gevonden curve. In figuur VI-12 zijn de curves afgebeeld met de waarden van de reactieconstanten, die gebruikt zijn, erbij vermeld.

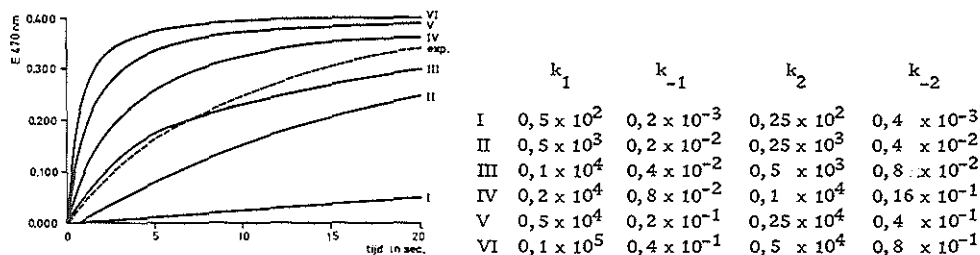


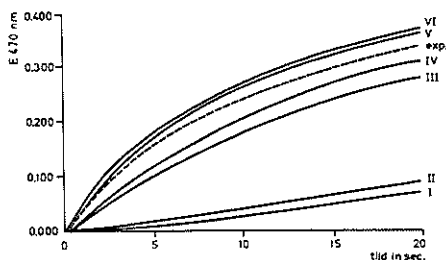
Fig. VI-12. Voorbeelden van simulatie-curves met waarden van de reactieconstanten, die in de goede verhouding gekozen waren wat de K-waarden betreft.  
De experimentele curve werd opgenomen met

$$[\text{Tr}_\text{O}] = 125 \mu\text{mol/l} \quad [\text{Fe}_\text{O}] = 190 \mu\text{mol/l} \quad [\text{HCO}_3^-] = 25 \text{ mmol/l}.$$

Uit de resultaten valt af te leiden dat de waarden van  $k_1 = 0,5 \times 10^2$  respectievelijk  $0,5 \times 10^3$  zeker te laag zijn en de waarden  $0,2 \times 10^4$ ,  $0,5 \times 10^4$  en  $0,1 \times 10^5$  zeker te hoog zijn.

De vraag rees in hoeverre wij ook reeksen reactieconstanten in de berekening moesten betrekken die niet aan de voorwaarden b en c voldeden. Dit in verband met het probleem in hoeverre met andere waarden voor  $k_{-1}$ ,  $k_2$  en  $k_{-2}$  een waarde van  $k_1$ , die in het voorgaande te hoog of te laag werd bevonden, toch nog tot een juiste curve kon leiden. Daartoe werd nagegaan of bij een zo laag mogelijke  $k_{-1}$  en  $k_{-2}$ , de limiet 0, en een zo hoog mogelijke  $k_2$  een waarde voor  $k_1$  van  $0,5 \times 10^2$  en  $0,5 \times 10^3$  een aanvaardbaar resultaat gaf. Dit staat weergegeven in figuur VI-13.

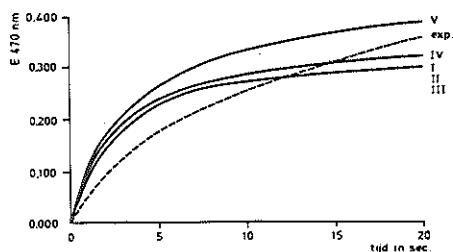
Evenzo werd nagegaan of  $k_1$  gelijk aan  $0,2 \times 10^4$ , tot een bruikbare curve zou kunnen leiden als  $k_2$  laag werd gekozen bij gelijkblijvende  $k_{-1}$  en  $k_{-2}$ , gekozen werd de limiet 0, zie figuur VI-14. Daarna werd nagegaan of bij toenemende  $k_{-1}$  en  $k_{-2}$  bij een  $k_1$  van  $0,2 \times 10^4$  aanvaardbare curves konden worden verkregen.



	$k_1$	$k_{-1}$	$k_2$	$k_{-2}$
I	$0,5 \times 10^2$	0	$0,1 \times 10^4$	0
II	$0,5 \times 10^2$	0	$0,1 \times 10^5$	0
III	$0,5 \times 10^3$	0	$0,5 \times 10^3$	0
IV	$0,5 \times 10^3$	0	$0,1 \times 10^4$	0
V	$0,5 \times 10^3$	0	$0,1 \times 10^5$	0
VI	$0,5 \times 10^3$	0	$0,1 \times 10^6$	0

Fig. VI-13. Voorbeelden van simulatie-curves met wisselende waarden voor  $k_1$  en  $k_2$ , waarbij  $k_{-1}$  en  $k_{-2}$  gelijk aan 0 waren.

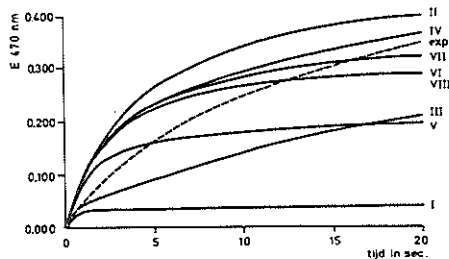
$$[\text{Tr}_\text{O}] = 125 \mu\text{mol/l} \quad [\text{Fe}_\text{O}] = 190 \mu\text{mol/l} \quad [\text{HCO}_3^-] = 25 \text{ mmol/l}.$$



	$k_1$	$k_{-1}$	$k_2$	$k_{-2}$
I	$0,2 \times 10^4$	0	0	0
II	$0,2 \times 10^4$	0	$0,1 \times 10^1$	0
III	$0,2 \times 10^4$	0	$0,1 \times 10^2$	0
IV	$0,2 \times 10^4$	0	$0,1 \times 10^3$	0
V	$0,2 \times 10^4$	0	$0,1 \times 10^4$	0

Fig. VI-14. Voorbeelden van simulatie-curves met voor  $k_1$  de waarde  $0,2 \times 10^4$ , voor  $k_2$  wisselende waarden en  $k_{-2}$  en  $k_{-1} = 0$ .

$$[\text{Tr}_\text{O}] = 125 \mu\text{mol/l} \quad [\text{Fe}_\text{O}] = 190 \mu\text{mol/l} \quad [\text{HCO}_3^-] = 25 \text{ mmol/l}.$$



	$k_1$	$k_{-1}$	$k_2$	$k_{-2}$
I	$0,2 \times 10^4$	$0,2 \times 10^1$	$0,2 \times 10^2$	$0,2 \times 10^{-2}$
II	$0,2 \times 10^4$	$0,2 \times 10^1$	$0,2 \times 10^3$	$0,2 \times 10^{-2}$
III	$0,2 \times 10^4$	$0,2 \times 10^1$	$0,2 \times 10^4$	$0,2 \times 10^{-2}$
IV	$0,2 \times 10^4$	$0,2 \times 10^0$	$0,2 \times 10^4$	$0,2 \times 10^{-2}$
V	$0,2 \times 10^4$	$0,2 \times 10^0$	$0,2 \times 10^3$	$0,2 \times 10^{-2}$
VI	$0,2 \times 10^4$	$0,2 \times 10^{-1}$	$0,2 \times 10^3$	$0,2 \times 10^{-2}$
VII	$0,2 \times 10^4$	$0,2 \times 10^{-4}$	$0,2 \times 10^3$	$0,2 \times 10^{-2}$
VIII	$0,2 \times 10^4$	$0,2 \times 10^{-2}$	$0,2 \times 10^3$	$0,2 \times 10^{-2}$

Fig. VI-15a. Voorbeelden van simulatie-curves met wisselende waarden voor de reactieconstanten.

$$[\text{Tr}_\text{O}] = 125 \mu\text{mol/l} \quad [\text{Fe}_\text{O}] = 190 \mu\text{mol/l} \quad [\text{HCO}_3^-] = 25 \text{ mmol/l}.$$

Een en ander werd ook gedaan met  $k_1$  gelijk aan  $0,5 \times 10^3$  en  $0,1 \times 10^4$ . Uit de resultaten, weergegeven in figuur VI-15a, b en c, volgt, dat inderdaad variatie van  $k_2$ ,  $k_{-1}$  en  $k_{-2}$  buiten de voorwaarden weergegeven in b en c, binnen bepaalde grenzen tot bruikbare curves kan leiden. Wij besloten dus bij verdere simulatie-proeven ook combinaties van  $k$ -waarden te gebruiken die niet overeen komen met de voorwaarden b en c. Dit maakte het simulatie-proces uiteraard veel ingewikkelder.

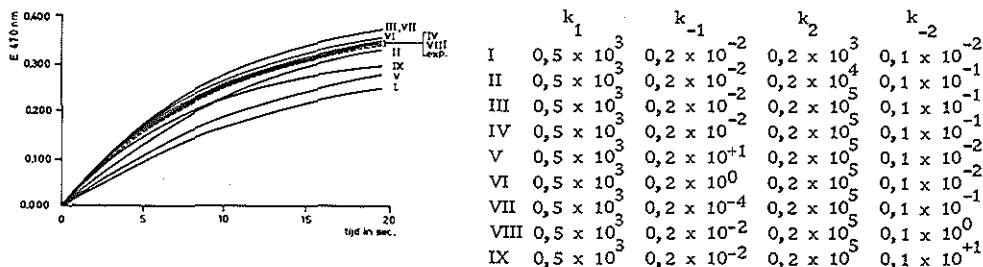


Fig. VI-15b. idem als fig. VI-15a.

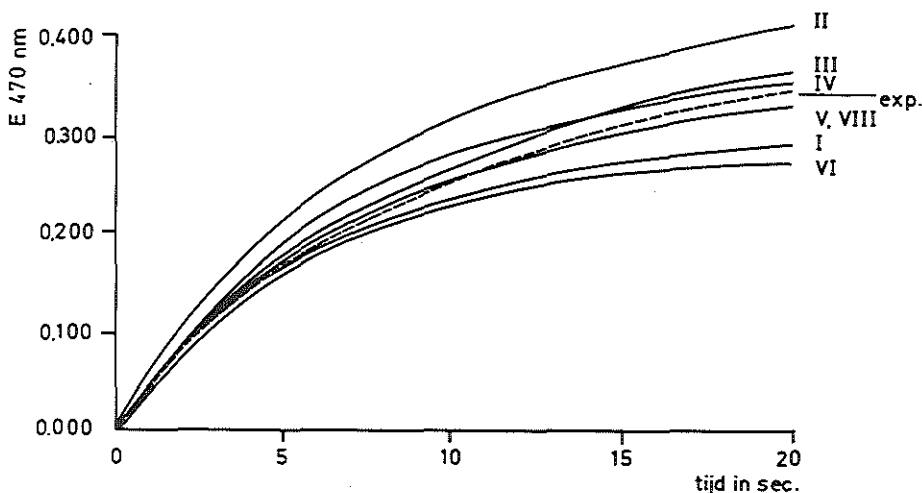


Fig. VI-15c. Idem als fig. VI-15a. Hierbij werden de volgende reactieconstanten gebruikt:

	$k_1$	$k_{-1}$	$k_2$	$k_{-2}$
I	$0,1 \times 10^4$	$0,2 \times 10^{-2}$	$0,2 \times 10^3$	$0,1 \times 10^{-1}$
II	$0,1 \times 10^4$	$0,2 \times 10^{-2}$	$0,2 \times 10^4$	$0,1 \times 10^{-1}$
III	$0,1 \times 10^4$	$0,2 \times 10^0$	$0,2 \times 10^4$	$0,1 \times 10^{-1}$
IV	$0,1 \times 10^4$	$0,2 \times 10^{-2}$	$0,1 \times 10^4$	$0,2 \times 10^{-1}$
V	$0,1 \times 10^4$	$0,2 \times 10^{-2}$	$0,5 \times 10^3$	$0,1 \times 10^{-2}$
VI	$0,1 \times 10^4$	$0,2 \times 10^{-2}$	$0,2 \times 10^3$	$0,1 \times 10^0$
VII	$0,1 \times 10^4$	$0,2 \times 10^0$	$0,1 \times 10^4$	$0,1 \times 10^{-1}$

De vraag, die wij moesten beantwoorden, gezien de resultaten in het voorgaande vermeld, was of curves berekend uit een reeks k-waarden waarbij  $k_2$  groter dan  $k_1$ , een betere overeenstemming geven met de experimentele resultaten, dan curves berustend op voorwaarde c. Uit de gegevens weergegeven in figuur VI-15a, b en c bleek dit inderdaad het geval te zijn. Uitgaande van dit gegeven onderzochten wij welke reeksen k-waarden de beste curves gaven voor andere concentraties transferrine en ijzer. Onze resultaten zijn weergegeven in tabel VI-2 en in de figuren VI-16, 17 en 18.

Tabel VI-2

De waarden van de reactieconstanten, zoals deze met behulp van de simulatietechniek berekend zijn bij verschillende transferrine en ijzer (II) concentraties  $[\text{HCO}_3^-] = 25 \text{ mmol/l}$ .

conc. transferrine in $\mu\text{mol/l}$	conc. ijzer in $\mu\text{mol/l}$	$k_1$	$k_{-1}$	$k_2$	$k_{-2}$
125	355	$0,5 \times 10^3$	$0,2 \times 10^{-2}$	$0,2 \times 10^5$	$0,1 \times 10^{-1}$
125	270	$0,5 \times 10^3$	$0,2 \times 10^{-2}$	$0,2 \times 10^4$	$0,1 \times 10^{-1}$
125	190	$0,5 \times 10^3$	$0,2 \times 10^{-2}$	$0,2 \times 10^5$	$0,1 \times 10^0$
125	135	$0,5 \times 10^3$	$0,2 \times 10^{-2}$	$0,2 \times 10^5$	$0,1 \times 10^{-1}$
125	105	$0,5 \times 10^3$	$0,2 \times 10^{-2}$	$0,4 \times 10^4$	$0,1 \times 10^{-1}$
125	75	$0,1 \times 10^4$	$0,2 \times 10^{-2}$	$0,2 \times 10^5$	$0,1 \times 10^0$
85	190	$0,1 \times 10^4$	$0,2 \times 10^{-2}$	$0,2 \times 10^5$	$0,1 \times 10^{-1}$
85	135	$0,1 \times 10^4$	$0,2 \times 10^{-2}$	$0,2 \times 10^5$	$0,1 \times 10^0$
85	105	$0,1 \times 10^4$	$0,2 \times 10^{-2}$	$0,2 \times 10^5$	$0,1 \times 10^{-1}$
45	105	$0,4 \times 10^4$	$0,2 \times 10^{-2}$	$0,2 \times 10^5$	$0,1 \times 10^{-1}$
45	70	$0,2 \times 10^4$	$0,2 \times 10^{-2}$	$0,2 \times 10^5$	$0,1 \times 10^0$
45	35	$0,4 \times 10^4$	$0,2 \times 10^{-2}$	$0,2 \times 10^5$	$0,1 \times 10^{-1}$

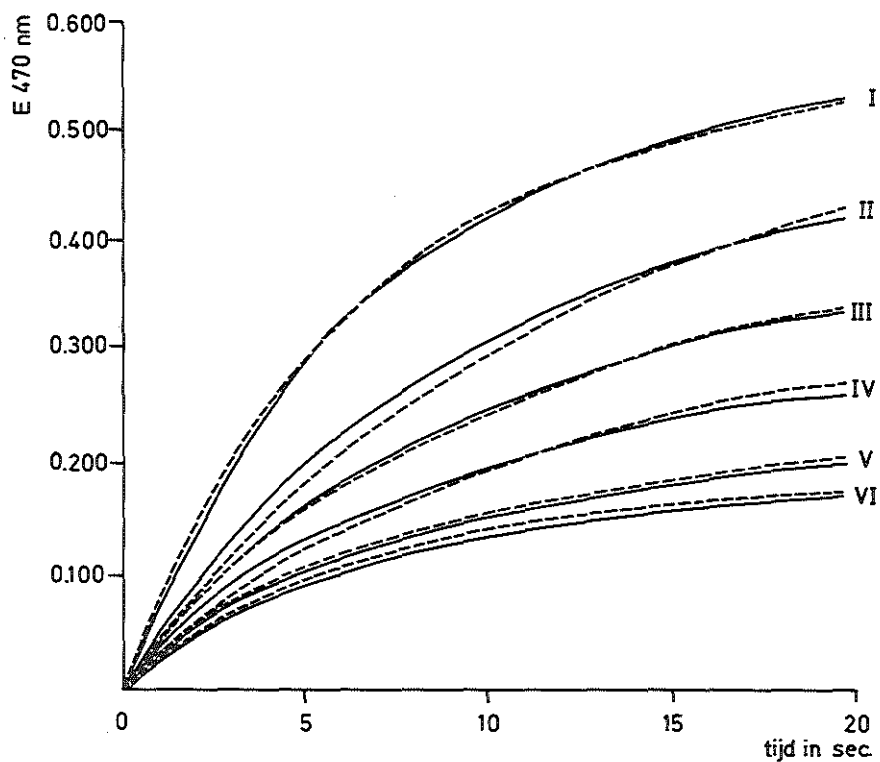


Fig. VI-16. De simulatie-curves die het beste overeenkomen met de experimenteel gevonden curves. De waarden van de reactieconstanten staan vermeld in tabel VI-2.

$$[\text{Tr}_o] = 125 \mu\text{mol/l}$$

$$[\text{HCO}_3^-] = 25 \text{ mmol/l}$$

$$[\text{Fe}_o] = \text{I } 355 \mu\text{mol/l}$$

$$\text{II } 270 \mu\text{mol/l}$$

$$\text{III } 190 \mu\text{mol/l}$$

$$\text{IV } 135 \mu\text{mol/l}$$

$$\text{V } 105 \mu\text{mol/l}$$

$$\text{VI } 75 \mu\text{mol/l}$$

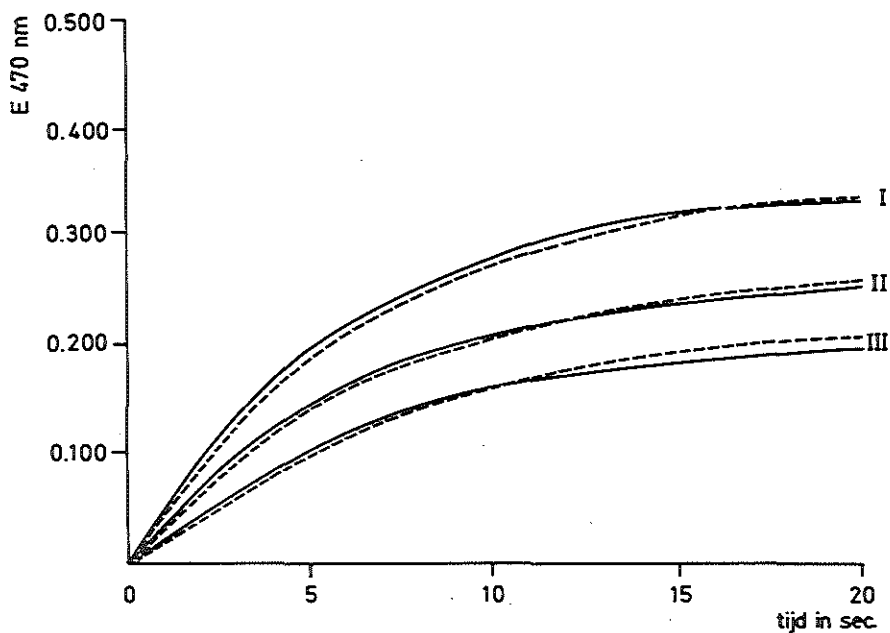


Fig. VI-17. De gesimuleerde curves die het beste overeenkomen met de experimenteel gevonden curves. De waarden van de reactieconstanten staan vermeld in tabel VI-2.

$[\text{Tr}_o] = 85 \mu\text{mol/l}$                        $[\text{HCO}_3^-] = 25 \text{ mmol/l}$   
 $[\text{Fe}_o] = \text{I } 105 \mu\text{mol/l}$   
                   II  $135 \mu\text{mol/l}$   
                   III  $190 \mu\text{mol/l}$

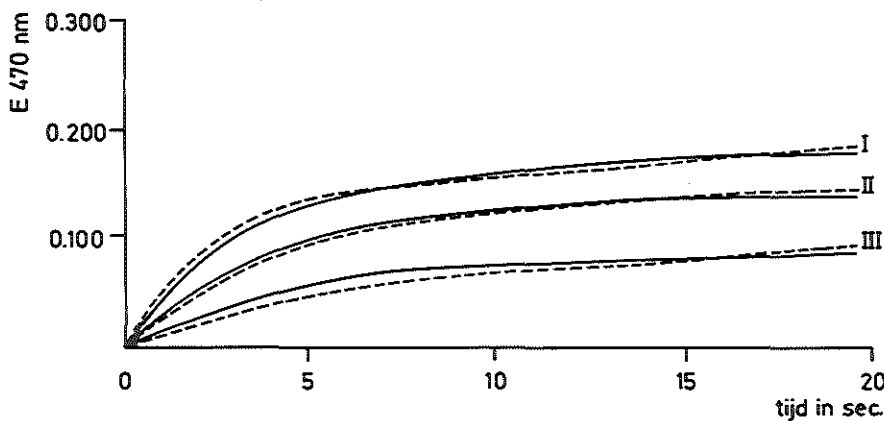


Fig. VI-18. De gesimuleerde curves die het beste overeenkomen met de experimenteel gevonden curves. De waarden van de reactieconstanten staan vermeld in tabel VI-2.

$[\text{Tr}_o] = 45 \mu\text{mol/l}$                        $[\text{HCO}_3^-] = 25 \text{ mol/l}$   
 $[\text{Fe}_o] = \text{I } 35 \mu\text{mol/l}$   
                   II  $75 \mu\text{mol/l}$   
                   III  $105 \mu\text{mol/l}$

In verband met de vraagstelling of de gevonden waarden van  $K_1$  en  $K_2$  zouden kunnen worden gecontroleerd met kinetische experimenten, berekenden wij curves met wisselende  $k_{-1}$  en  $k_{-2}$ . Deze resultaten zijn weergegeven in figuur VI-19.

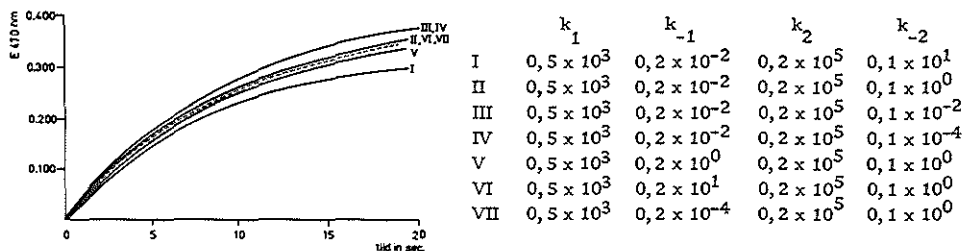


Fig. VI-19. De invloed van wisselende waarden voor  $k_{-1}$  en  $k_{-2}$  op het ijzertransferrine systeem.

$$[\text{Tr}_O] = 125 \mu\text{mol/l} \quad [\text{Fe}_O] = 190 \mu\text{mol/l} \quad [\text{HCO}_3^-] = 25 \text{ mmol/l}$$

In de discussie wordt op deze resultaten teruggekomen.

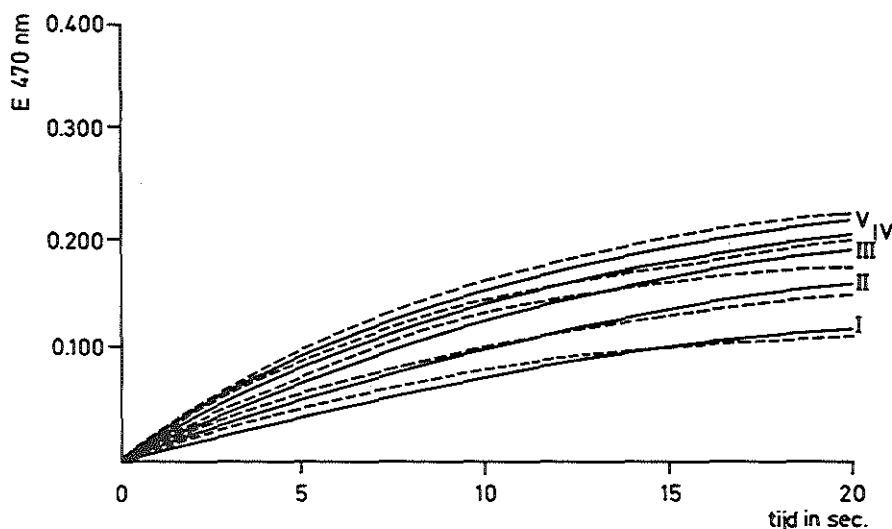


Fig. VI-20. De gesimuleerde curves die het beste overeenkomen met de experimenteel gevonden curves. Geen bicarbonaat aanwezig.

$[\text{Tr}_O] = 125 \mu\text{mol/l}$		$k_1$	$k_{-1}$	$k_2$	$k_{-2}$
$[\text{Fe}_O] = \text{I } 75 \mu\text{mol/l}$		$0,5 \times 10^3$	$0,2 \times 10^{-2}$	$0,2 \times 10^3$	$0,1 \times 10^{-2}$
II $115 \mu\text{mol/l}$		$0,5 \times 10^3$	$0,2 \times 10^{-2}$	$0,2 \times 10^3$	$0,1 \times 10^{-1}$
III $140 \mu\text{mol/l}$		$0,5 \times 10^3$	$0,2 \times 10^{-2}$	$0,2 \times 10^3$	$0,1 \times 10^{-2}$
IV $180 \mu\text{mol/l}$		$0,5 \times 10^3$	$0,2 \times 10^{-2}$	$0,2 \times 10^3$	$0,1 \times 10^{-2}$
V $270 \mu\text{mol/l}$		$0,5 \times 10^3$	$0,2 \times 10^{-2}$	$0,2 \times 10^3$	$0,1 \times 10^{-3}$

## Experimenten zonder bicarbonaat toevoeging

Op dezelfde wijze als beschreven bij de berekening van de reactieconstanten van het systeem, waarbij extra bicarbonaat was toegevoegd, werden ook hier via de simulatie-techniek inzichten verkregen in het reactieverloop.

In figuur VI-20 zijn een aantal berekende curves weergegeven, die het beste overeenkwamen met de bijbehorende experimenteel gevondene. Bij de figuur zijn de waarden van de bijbehorende reactieconstanten vermeld.

## CONCLUSIE

De berekeningen van de reactieconstanten geven ons een inzicht in de waarden van  $k_1$  en  $k_2$ .

De waarden van  $k_{-1}$  en  $k_{-2}$  zijn veel moeilijker vast te stellen. Zoals reeds vermeld komen wij op dit onderdeel van ons experiment uitvoerig terug in de discussie.



## HOOFDSTUK VII

### DISCUSSIE

Als uitgangspunt voor de studie van bepaalde facetten van het transferrine-ijzer systeem kozen wij de opvatting dat ijzer en transferrine als volgt reageren.

$\text{Fe} + \text{Tr} \rightleftharpoons \text{TrFe}$  met als reactieconstanten  $k_1$  en  $k_{-1}$  en als evenwichts-

constante  $K_1 = \frac{k_1}{k_{-1}}$  .

$\text{Fe} + \text{TrFe} \rightleftharpoons \text{TrFe}_2$  met als reactieconstanten  $k_2$  en  $k_{-2}$  en als evenwichts-

constante  $K_2 = \frac{k_2}{k_{-2}}$  .

De redenen voor deze keuze hebben wij in hoofdstuk I geformuleerd. Bij de bezwaren tegen de opvatting, dat de omzetting als ééntrapsreactie verloopt, dus  $2\text{Fe} + \text{Tr} \rightleftharpoons \text{TrFe}_2$ , zoals Woodworth en medewerkers<sup>55)</sup> deze probeerden aan te tonen, is recent nog een zwaarwegend argument ingebracht. Williams e. a.<sup>72)</sup> toonden aan dat de sedimentatie-coëfficiënten van ovotransferrine verzadigd voor 0, respectievelijk 25, 50, 75 en 100% met ijzer weinig uiteenlopen. Wij hebben dit ook gevonden op ons laboratorium. Hiermede sluiten zij dus uit dat er een  $\text{Tr}_2\text{Fe}_2$  complex zou kunnen bestaan. Zoals reeds vermeld in hoofdstuk I, trachten Woodworth c.s. het bestaan van een dergelijk complex aannemelijk te maken.

Onze bedoeling was, de beide bovengenoemde reacties te karakteriseren door  $K_1$  en  $K_2$  te bepalen en de orde van grootte van de reactieconstanten

vast te leggen. In hoofdstuk I is beschreven dat het ijzer in de ijzertransferrine complexen in de driewaardige vorm voorkomt. Het ligt dus voor de hand met Fe (III) te werken. Wij stelden ons voor  $K_1$  en  $K_2$  te bepalen in proefomstandigheden, die zo eenvoudig mogelijk waren en tegelijkertijd zo goed mogelijk aansloten bij de omstandigheden zoals deze in vivo bestaan. De pH diende dus 7,4 te zijn. Het werken met Fe (III) zonder meer is echter bij deze zuurgraad onmogelijk, daar het oplosbaarheidsproduct van ferrihydroxide bijzonder klein is<sup>67)</sup>. Wij overwogen daarom van Fe (II) gebruik te maken, het oplosbaarheidsproduct van ferrohydroxide is voor onze proefomstandigheden voldoende groot<sup>68)</sup>. Hoewel in de begintijd van het onderzoek aangaande de ijzerbinding door transferrine veelvuldig met Fe (II) werd gewerkt, is dit in de laatste jaren slechts sporadisch het geval geweest. Als voorbeeld moge dienen het in hoofdstuk I uitvoerig beschreven onderzoek van Ross e.a. over de kinetiek<sup>42)</sup>.

De enige mogelijkheid echter om bovengenoemde reacties te bestuderen met Fe (III) bij pH 7,4 is door gebruik te maken van chelaatvormers als EDTA en citraat. Dit is gedaan door Davis e.a.<sup>36)</sup> en Aasa e.a.<sup>43)</sup>; de resultaten zijn beschreven in hoofdstuk I. In de tabellen I-1 en I-2 staan de door beide werkgroepen gevonden K-waarden vermeld.

Het leek ons gewenst deze gegevens te kunnen vergelijken met gegevens afkomstig van het transferrine-Fe (II) systeem. Dit te meer omdat omtrent het reactiemechanisme van de vorming van het ijzertransferrine complex weinig bekend is; een aantal gegevens wijst op de mogelijkheid, dat Fe (II) beter reageert met transferrine dan Fe (III) en het is niet uitgesloten dat onder fysiologische omstandigheden althans een gedeelte van het ijzer, indien dit vrij als ion voorkomt, Fe (II) is.

De door ons gevonden waarden voor  $K_1$  en  $K_2$ , verkregen met verschillende methoden van het transferrine-Fe (II) systeem, zijn samengevat in tabel VII-1. De betekenis van de gevonden waarden voor  $K_1$  en  $K_2$  kan op de volgende wijze worden geïllustreerd.

In hoofdstuk III leidden wij op pagina 68 een uitdrukking af voor het verzadigingspercentage als functie van de concentratie niet-gebonden ijzer,  $K_1$  en  $K_2$  luidende:

$$s = \frac{1 + 2K_2 \times [\text{Fe}]}{\frac{2}{K_1 \times [\text{Fe}]} + 2 + 2K_2 \times [\text{Fe}]} \times 100 \quad [17]$$

Tabel VII-1

Overzicht van de door ons gevonden waarden van de dissociatieconstanten.

Gebruikte proefopzet	$K_1$	Standaard- afw. van $K_1$	$K_2$	Standaard- afw. van $K_2$
Dialyse-opzet met ascorbinezuur	$0,25 \times 10^6$	$0,15 \times 10^6$	$0,50 \times 10^5$	$0,30 \times 10^5$
Dialyse-opzet met $H_2$ -doorleiding	$0,12 \times 10^6$	$0,08 \times 10^6$	$0,16 \times 10^5$	$0,08 \times 10^5$
Opzet berustend op optische metingen	$0,20 \times 10^6$	$0,10 \times 10^6$	$0,50 \times 10^5$	$0,30 \times 10^5$

In figuur VII-1 is het door formule [17] beschreven verband tussen  $s$  en  $[Fe]$  grafisch weergegeven voor de door ons gevonden maximale en minimale waarden van  $K_1$  en  $K_2$  uit tabel VII-1.

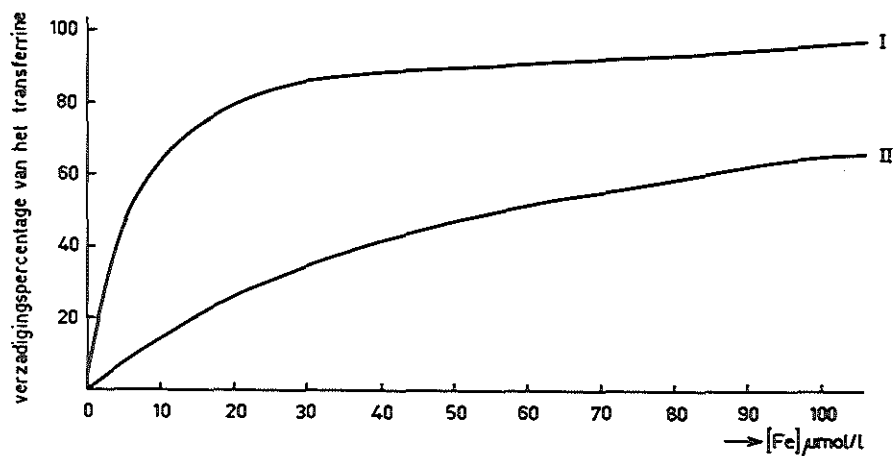


Fig. VII-1. Het verband tussen het verzadigingspercentage van transferrine en  $Fe$  bij twee paar  $K$ -waarden.

Curve I:  $K_1 = 0,4 \times 10^6$      $K_2 = 0,8 \times 10^5$   
 Curve II:  $K_1 = 0,4 \times 10^5$      $K_2 = 0,8 \times 10^4$ .

Uit de figuur blijkt duidelijk dat bij  $K$ -waarden in de door ons gevonden orde van grootte een aanmerkelijke hoeveelheid niet-gebonden ijzer voorkomt. Bij een verzadigingspercentage dat in humaan serum wordt aangetroffen, is zelfs bij de hoogste  $K$ -waarden nog een concentratie van niet-

gebonden ijzer aanwezig, die gelijk is aan  $2,5 \mu\text{mol/l}$ . Bovendien zien wij, dat een flinke overmaat ijzer aan transferrine moet worden toegevoegd, voordat sprake kan zijn van een 100% verzadiging.

In vergelijking met de door Davis<sup>56)</sup> gevonden K-waarden, zijn de onze zeer klein. Bij de door deze onderzoekers opgegeven K-waarden is er vrijwel geen sprake van niet-gebonden ijzer. Katz en Jandl c.s.<sup>48)</sup> wijzen dan ook op grond van deze K-waarden de opvatting van Laurell<sup>49)</sup> af over de betekenis van ijzer-ionen voor het ijzertransport via de interstitiële vloeistof. Onze bezwaren tegen Davis' proefopzet beschreven wij in hoofdstuk I.

In vergelijking met de door Aasa e.a.<sup>43)</sup> gevonden K-waarden zijn de door ons gevonden waarden eveneens klein, zij het dat het verschil niet zo groot is als met de waarden van Benson e.a. Evenals Aasa vinden wij dat  $K_1$  en  $K_2$  van dezelfde orde van grootte zijn, dit in tegenstelling tot het door Davis e.a. gevonden feit dat  $K_1 = 100K_2$ . Ook bij waarden van  $K_1$  en  $K_2$ , zoals gevonden door Aasa c.s. is geen sprake van niet-gebonden ijzer als factor van betekenis.

Gezien het opmerkelijke verschil tussen de waarden van Davis e.a., Aasa e.a. en onze resultaten, trachtten wij nog enkele aanvullende gegevens betreffende de orde van grootte van  $K_1$  en  $K_2$  te verkrijgen.

In de eerste plaats uit de resultaten die wij vonden met behulp van de opgenomen electronspinresonantie-spectra. Wij vonden met deze techniek dat aan het transferrine ongeveer 60% meer ijzer dan een equivalente hoeveelheid berekend op grond van 2 mol ijzer en 1 mol transferrine moest worden toegevoegd om een vrijwel volledige verzadiging te verkrijgen. Dit komt overeen met de waarden van de dissociatieconstanten zoals wij die vonden.

In de tweede plaats zijn wij met behulp van de gegevens van een aantal optische experimenten nagegaan of bij verdunning van bepaalde ijzertransferrine-oplossingen afwijkingen ontstaan van het lineaire verband. Indien de K-waarden zeer groot zijn, dan is uiteraard geen noemenswaardige invloed van de verdunning op de dissociatie van de ijzertransferrine complexen te verwachten. Een voorbeeld van de resultaten van een dergelijk experiment staat weergegeven in figuur VII-2.

De punten 2, 3 en 4 zijn ontstaan door meting na 24 uur van de extinctie bij 470 nm van de oplossingen die ontstaan door de hoogste concentratie (1) te verdunnen met buffer waaraan de normale componenten waren toegevoegd,

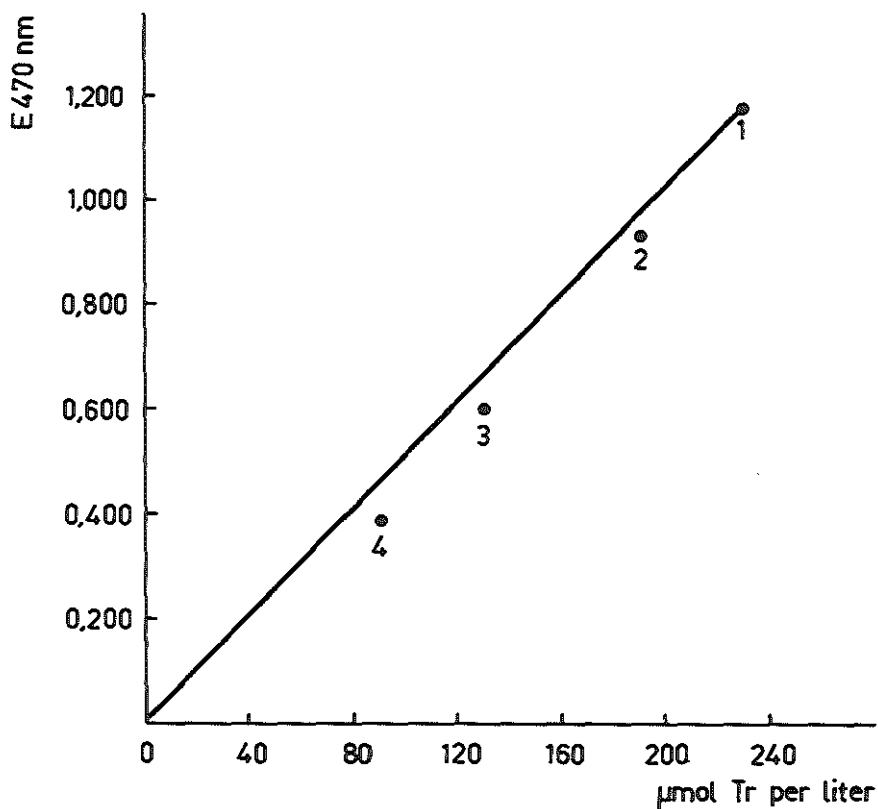


Fig. VII-2. Het effect van verdunning van een transferrine-ijzer-oplossing op de extinctie bij 470 nm. De verzadigings percentages van de vier punten zijn resp. 98, 93, 89, en 80%.

zoals bicarbonaat, ascorbinezuur en natriumchloride. Duidelijk blijkt het bestaan van de afwijkingen van het lineaire verband. Met behulp van de in hoofdstuk IV afgeleide relatie voor het verband tussen gemeten extinctie en verzadigingspercentage, werden de verzadigingspercentages die bij de punten 1, 2, 3 en 4 behoren uitgerekend. Deze berekende waarden zijn in de figuur VII-2 aangegeven.

Uit de figuur blijkt, dat verdunning invloed heeft op het systeem en wel in die zin, dat het complex gaat dissociëren bij deze handelwijze. Dit pleit voor de orde van grootte van  $K_1$  en  $K_2$  zoals wij die vonden.

De resultaten die wij verkregen met de experimenten over de reactiekinetiek en de daaruit volgende waarden voor  $k_1$ ,  $k_{-1}$ ,  $k_2$  en  $k_{-2}$  geven slechts de mogelijkheid, zoals uit hoofdstuk VI blijkt, een summiere uitspraak

te doen over de orde van grootte van de evenwichtsconstanten. Opgemerkt kan worden dat een bovengrens voor  $K_1$  respectievelijk  $K_2$  kan worden gegeven van  $0,2 \times 10^6$  en respectievelijk  $0,2 \times 10^5$ . Een benedengrens is niet vast te stellen met deze methode.

In verband met het feit, dat de door ons gevonden K-waarden een beeld geven van de binding van ijzer aan transferrine, dat nogal afwijkt van de algemeen gangbare opvatting volgens welke er geen "vrij" ijzer voorkomt, is het van betekenis het door ons gebruikte systeem nauwkeurig te analyseren.

Een belangrijk punt is of het transferrine-ijzer complex dat uit Fe (II) ontstaat, dezelfde eigenschappen heeft als het uit Fe (III) ontstane complex. Teneinde hieromtrent enige gegevens te verkrijgen, werd onderzoek gedaan met de electronspinresonantie-techniek. De resultaten hiervan zijn beschreven in hoofdstuk V.

Aasa en medewerkers<sup>43)</sup> namen spectra op van ijzertransferrine ontstaan uit Fe (III). Wij konden vaststellen dat er geen principieel verschil bestaat wat de ijzerbinding betreft in ijzertransferrine, ontstaan uit Fe (II) respectievelijk Fe (III) en apotransferrine. De opbouw van het E.S.R.-spectrum wijst erop, dat het ijzer in beide gevallen gebonden is via een octaëdrische omringing. Het ijzer is, ook als van Fe (II) wordt uitgegaan, in het ijzertransferrine in een toestand die met Fe (III) kan worden aangegeven. Er bestaat een gering verschil tussen de spectra van Aasa c.s. en de onze; een verklaring hiervoor kunnen wij niet geven. Uiteraard is het feit, dat het ijzer, wanneer het aan transferrine gebonden is, in een andere toestand verkeert dan wanneer het als Fe (II) vrij voorkomt, een belangrijk gegeven voor ons systeem. Het betekent dat de vraag gesteld moet worden in hoeverre de in de aanvang van dit hoofdstuk als uitgangspunten gekozen reactievergelijkingen, moeten worden aangevuld. Hierop wordt later teruggekomen. Ook de optische absorptie spectra van ijzertransferrine vertoonden geen verschil bij het opladen van transferrine met Fe (II) of Fe (III). Wel valt op dat er een duidelijk verschil is in reactiemechanisme van transferrine met Fe (II) en transferrine met Fe (III). Dit kon ook met de E.S.R.-techniek worden vastgesteld.

In het door ons gekozen systeem diende de pH op 7,4 te worden gehandhaafd. Teneinde een buffer te gebruiken die voldoende buffercapaciteit heeft en geen onfysiologische bestanddelen bevat (bijvoorbeeld een Tris-buffer), kozen wij een 0,05 molaire fosfaatbuffer pH 7,4. Young en Perkins<sup>45)</sup>

maken melding van het feit, dat fosfaat-ionen invloed zouden hebben op de molaire extinctiecoëfficiënt van ijzertransferrine bij 470 nm.

Zoals in hoofdstuk IV is aangegeven, konden wij deze resultaten niet bevestigen. In ons systeem heeft fosfaat geen invloed op de absorptie door ijzertransferrine bij 470 nm en ook niet bij andere golflengten.

Dat fosfaat-ionen invloed hebben op de uitkomsten van onze experimenten doordat er ijzerfosfaat complexen kunnen ontstaan, is niet geheel uitgesloten. In hoofdstuk II is opgegeven, dat er een zeer bepaalde volgorde van toevoeging van de diverse reagentia, bij het bereiden van de oplossingen die voor de dialyse werden gebruikt, noodzakelijk was om neerslagvorming te voorkomen. Ook het feit dat een langdurige dialysetijd nodig was, werpt vragen op. Opgemerkt kan worden dat de tijd die Aasa koos, 2 tot 3 weken bedroeg, dat is 6 tot 7 keer zo lang.

De vraag in hoeverre bicarbonaat invloed heeft op  $K_1$  en  $K_2$  is moeilijk te beantwoorden. De dialyse-experimenten waarbij extra  $\text{HCO}_3^-$  werd toegevoegd, leverden dezelfde resultaten op als die waarbij dit niet geschiedde. Maar zoals in hoofdstuk III werd berekend, is er onder onze proefomstandigheden bij de dialyse met ascorbinezuur altijd 0,3 mmol/l  $\text{HCO}_3^-$  aanwezig. In de proeven waarbij waterstofgas werd doorgeleid, zal de bicarbonaat-concentratie veel lager zijn geweest. De K-waarden bij deze experimenten zijn van dezelfde orde van grootte, zoals werd vermeld in het betreffende hoofdstuk.

Toevoeging van extra bicarbonaat had in ieder geval wel veel invloed op de reactiesnelheid. Onze conclusie moet dan ook zijn, op grond van onze experimenten, dat bicarbonaat het karakter van een katalysator heeft en dat het dus juist is deze stof bij de berekening van  $K_1$  en  $K_2$  buiten beschouwing te laten. Zoals reeds in dit hoofdstuk vermeld is, wilden wij nagaan of de berekeningen van de reactieconstanten, waarmee het systeem te beschrijven is, ons een inzicht konden verschaffen in de orde van grootte van de dissociatieconstanten. Uit de oriënterende experimenten, zoals beschreven in hoofdstuk VI, vonden wij dat de vormingssnelheid van ijzertransferrine kleiner was wanneer uitgegaan werd van Fe (III), dan wanneer uitgegaan werd van Fe (II). Dit is in strijd met de uitspraak van Ross en medewerkers<sup>42)</sup>, die stellen dat aanvankelijk Fe (III) sneller een complex vormt met transferrine dan Fe (II) dit doet, maar dat bij het verdergaan van de reactie Fe (II) met transferrine een groter concentratie-complex levert dan Fe (III). Dit hebben wij dus nooit kunnen vinden bij onze experimenten.

Onze resultaten komen dus overeen met die van Surgenor<sup>17)</sup>. Een verklaring voor deze verschillende resultaten kunnen wij niet geven. Bij de experimenten waarvan de resultaten zijn weergegeven in figuur VI-6, werd nagegaan of ascorbinezuur nog invloed had op de reactiesnelheid van het systeem waarbij transferrine en ijzer (III) tezamen waren gebracht. In genoemde figuur kwam duidelijk tot uiting dat na ascorbinezuur toevoeging de reactiesnelheid verhoogd was. Werd daarentegen van Fe (II) uitgegaan, in plaats van Fe (III), dan maakte toevoeging van dit reductans geen verschil. Zoals reeds eerder werd vermeld, heeft bicarbonaat invloed op de reactiesnelheid. Uit de oriënterende experimenten was op te maken dat de reactiesnelheid met een factor twee à drie vergroot was. Wij hebben dit wat Fe (II) betreft kunnen nagaan met de "stopped-flow" techniek, tezamen met de beschreven simulatie methode. De resultaten van deze werkwijzen staan vermeld in hoofdstuk VI. Zij geven aanleiding tot enkele beschouwingen. Uit deze resultaten blijkt dat bij de experimenten waarbij extra bicarbonaat was toegevoegd,  $k_2$  veel groter is dan  $k_1$ . Dit is in strijd met een zuiver statistische benadering waaruit volgt, dat  $k_1$  tweemaal zo groot moet zijn als  $k_2$ . Zoals vermeld was dit een van onze uitgangspunten, maar bij het uitvoeren van de berekeningen kwamen wij tot de conclusie dat wij dit niet konden handhaven. Dit wordt in hoofdstuk VI aan de hand van enkele figuren geïllustreerd.

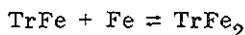
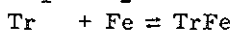
Bij de experimenten zonder extra bicarbonaat toevoeging bleek na berekening  $k_1$  een factor 2 kleiner te zijn geworden en  $k_2$  een factor 50 tot 100. Hieruit concluderen wij dat extra bicarbonaat een grotere invloed heeft op  $k_2$  dan op  $k_1$  en dat bij proeven zonder extra bicarbonaat toevoeging  $k_1$  groter is dan  $k_2$ . De mogelijkheid bestaat, dat de reeds aanwezige hoeveelheid bicarbonaat (0,3 mmol/l) zijn invloed heeft op  $k_1$  en dat pas bij verhoging van deze hoeveelheid door extra toevoeging van dit anion de invloed op  $k_2$  merkbaar wordt. De berekeningen van de reactieconstanten via de simulatie-experimenten, leerden ons tevens dat de waarden van  $k_{-1}$  en  $k_{-2}$  weinig invloed op het systeem hebben. Slechts bij verregaande vergroting hiervan en wel in de orde van grootte van  $k_1$  en  $k_2$ , werd de invloed merkbaar op het verloop van de curves.

Er werden ook een aantal simulatieproeven uitgevoerd waarbij  $k_{-1}$  en  $k_{-2}$  de waarde nul kregen, ook dit had weinig invloed. Opgemerkt dient te worden dat de diverse reacties van transferrine met ijzer slechts de eerste 20 seconden gevolgd werden. Uit het bovenstaande kunnen wij dus de conclusie



trekken dat met de gebruikte techniek de waarden voor  $k_1$  en  $k_2$  met een redelijke nauwkeurigheid bepaald kunnen worden en dat dit voor  $k_{-1}$  en  $k_{-2}$  in veel mindere mate mogelijk is. Het is dus niet goed mogelijk een uitspraak te doen over de waarden van de dissociatieconstanten  $K_1$  en  $K_2$ . Wij zijn geneigd aan te nemen dat het quotient  $\frac{k_1}{k_{-1}}$  dezelfde orde van grootte heeft als de waarde die wij vonden voor  $K_1$ .

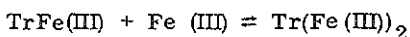
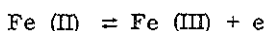
Tenslotte willen wij nog enkele opmerkingen maken over de probleemstelling die rijst wanneer wij ons afvragen op welke reacties de door ons berekende grootheden slaan. Wij hebben  $K_1$  en  $K_2$  berekend voor het systeem



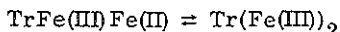
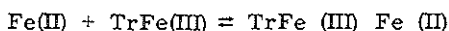
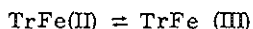
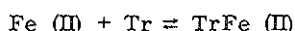
Hierbij hebben wij ijzer voornamelijk als Fe (II) gebruikt. Met behulp van de E.S.R.-spectra hebben wij kunnen bevestigen dat het ijzer in de ijzer-transferrine verbinding voorkomt in een vorm die het beste als Fe (III) te beschrijven is. Dit betekent dat er drie mogelijkheden zijn:

- Fe (II) moet eerst tot Fe (III) geoxideerd worden voordat het als Fe (III) reageert met transferrine.
- Het ijzer ondergaat op het eiwitmolecuul een valentie-verandering.
- Idem als b. maar volgens een ander reactiemechanisme.

Wanneer a. het geval zou zijn, dan hebben wij dus te maken met de volgende reacties:

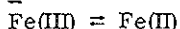
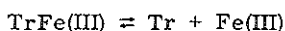
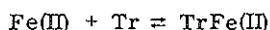


Indien b. het geval is, dan kunnen wij het systeem als volgt beschrijven:



Hierdoor blijft het uitgangspunt dat achter onze ideeën omtrent  $K_1$  en  $K_2$  staat, gehandhaafd.

Indien c. het geval is, dan spelen de volgende reacties een rol:

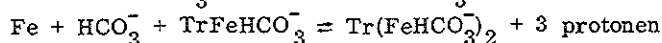
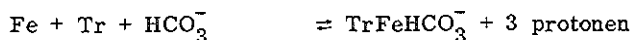


Voor de tweede reactie, dus  $\text{TrFe} + \text{Fe}$ , kunnen wij een dergelijk mechanisme

opschrijven.

Het is, wanneer c. het geval zou zijn, een zeer gecompliceerd systeem geworden, dat moeilijk te beschrijven is.

Zoals in hoofdstuk I is vermeld, namen Aasa e. a.<sup>43)</sup> aan dat bij de reactie van ijzer en transferrine per 1 atoom ijzer 1 molecuul bicarbonaat gebruikt wordt en 3 protonen worden vrijgemaakt. De reactievergelijkingen luiden dan:



De dissociatieconstanten  $\bar{K}_1$  en  $\bar{K}_2$  worden dan:

$$\bar{K}_1 = \frac{[\text{TrFeHCO}_3^-] \times [\text{H}^+]^3}{[\text{Fe}][\text{Tr}][\text{HCO}_3^-]}$$

$$\bar{K}_2 = \frac{[\text{Tr}(\text{FeHCO}_3^-)_2][\text{H}^+]^3}{[\text{Fe}][\text{TrFeHCO}_3^-] \times [\text{HCO}_3^-]}$$

$$\text{Dit betekent dus dat } \bar{K}_1 = K_1 \times \frac{[\text{H}^+]^3}{[\text{HCO}_3^-]} \text{ en } \bar{K}_2 = K_2 \times \frac{[\text{H}^+]^3}{[\text{HCO}_3^-]}$$

Hierin zijn  $\bar{K}_1$  en  $\bar{K}_2$  de constanten volgens de methode van Aasa e. a. uitgedrukt en  $K_1$  en  $K_2$  de constanten zoals wij die steeds hebben aangegeven.

Door Aasa e. a. werden zij de "schijnbare" constanten genoemd.

Brengen wij de pH en de  $[\text{HCO}_3^-]$  in rekening, dan vinden wij voor  $\bar{K}_1 = 10^{-21}$  en  $\bar{K}_2 = 10^{-21}$ .

In tabel VII-2 zijn de diverse waarden van de dissociatieconstanten weer-

Tabel VII-2

De waarden van de dissociatieconstanten, beschreven door Aasa e. a.<sup>43)</sup> en in dit proefschrift, waarbij pH en bicarbonaat in rekening zijn gebracht.

Beschreven	pH	$\text{HCO}_3^-$ mol/l	$K_1$	$K_2$	$\bar{K}_1$	$\bar{K}_2$	Gebruikte chelaatvorm
door Aasa e. a.	9	$5 \times 10^{-2}$	$10^3$	$0,25 \times 10^2$	$5,0 \times 10^{28}$	$1,25 \times 10^{28}$	EDTA
door Aasa e. a.	6,5	$5 \times 10^{-5}$	$3 \times 10^3$	$0,75 \times 10^3$	$3,60 \times 10^{18}$	$0,90 \times 10^{17}$	citraat
in dit proefschrift	7,4	$3 \times 10^{-4}$	$2 \times 10^{-21}$	$0,60 \times 10^{-20}$	$0,3 \times 10^6$	$0,5 \times 10^5$	geen

gegeven zoals Aasa c.s. en wij deze berekenden. Ook zijn in deze tabel de K-waarden, van Aasa c.s., weergegeven, wanneer wij pH en/of bicarbonaat buiten beschouwing laten. Duidelijk is uit deze getallen te zien, dat de beide methoden door Aasa c.s. gebruikt, verschillende resultaten opleveren en dat onze gevonden waarden steeds sterk blijven afwijken van de overigen. Opgemerkt moet hierbij worden dat dezelfde groep, zoals reeds vermeld, enkele jaren later het bicarbonaat-ion weglaat<sup>44)</sup>.

In het literatuuroverzicht maakten wij melding van het onderzoek dat Wenn en Williams<sup>52)</sup> verrichtten met ovotransferrine. Het betrof hier hun iso-electrofocussing-experimenten. In dezelfde publicatie berekenden zij de diverse componenten van het ijzertransferrine systeem. Dit wil zeggen dat zij bij verschillende verzadigingspercentages van transferrine met ijzer de percentuele verhouding van [Tr], [TrFe] en [TrFe<sub>2</sub>] berekenden. Zij veronderstellen hierbij dat beneden een verzadigingspercentage van 100% geen vrij ijzer voorkomt.

In genoemde referentie leiden zij de volgende formules af waarin de percentuele verhouding van [Tr],[TrFe] en [TrFe<sub>2</sub>] aan de verzadiging van transferrine met ijzer wordt gekoppeld.

$$[\text{Tr}] = [\text{Tr}_0] - [\text{Fe}_0] + \frac{[\text{Fe}_0]^2}{4[\text{Tr}_0]}$$

$$[\text{TrFe}] = [\text{Fe}_0] - \frac{[\text{Fe}_0]^2}{2[\text{Tr}_0]}$$

$$[\text{TrFe}_2] = \frac{[\text{Fe}_0]^2}{4[\text{Tr}_0]}$$

Op grond van de formules [11], [17], [7] en [8] berekenden wij de percentuele verdeling van [Fe],[Tr],[TrFe] en [TrFe<sub>2</sub>] zoals die uit onze K-waarden volgt; ook berekenden wij de percentuele verdeling van [Tr],[TrFe] en [TrFe<sub>2</sub>] met de methode van Wenn en Williams. De uitkomsten van deze twee methoden staan weergegeven in figuur VII-3. Hierbij is de uitgangskoncentratie van transferrine gelijk aan 100 µmol/l, terwijl de begin-ijzerconcentraties wisselend zijn, deze lopen van 0 tot 400 µmol/l. Uit deze figuur is te zien dat vooral bij lagere percentages de overeenkomst groot is. Bij hogere verzadigingspercentages worden de verschillen aanmerkelijk. De oorzaak moet worden gezocht in het feit dat wij wel uitgaan van de aanwezigheid

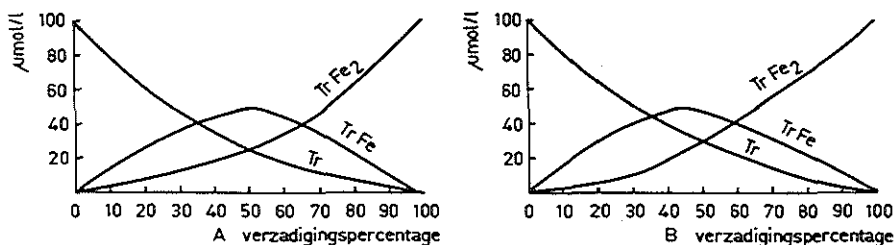


Fig. VII-3. Berekeningen van  $[Tr]$ ,  $[TrFe]$  en  $[TrFe_2]$ .

A. Volgens de methode van Wenn en Williams<sup>52</sup>).

B. Volgens [11], [17], [7] en [8].

Transferrine-concentratie in beide gevallen voor het toevoegen van ijzer bedroeg 100  $\mu\text{mol/l}$ .

van niet-gebonden ijzer, in tegenstelling tot Wenn en Williams.

Tot slot van deze discussie willen wij nogmaals stellen, dat de conclusies die wij trokken betreffende het ijzertransferrine systeem, niet zonder meer mogen worden doorgetrokken naar in vivo omstandigheden.

De volgende door ons waargenomen verschijnselen illustreren dit voortreffelijk. In hoofdstuk V zijn de resultaten van E.S.R.-experimenten, die met serum werden uitgevoerd, weergegeven. Uit de tabellen V-4 en V-5 en figuren V-5 en V-6 blijkt duidelijk dat afgaande op deze techniek het transferrine in serum met ijzer slecht te verzadigen is. Dit geldt in bijzondere mate, wanneer ijzer (III) wordt gebruikt. Wordt van gedialyseerd serum uitgegaan, dan volgt de ijzerverzadiging hetzelfde patroon als wij voor zuiver transferrine waarnamen, zoals uit tabel V-6 en figuur V-7 blijkt. De suggestie is, dat door het dialyseren van serum een component wordt verwijderd of geïnactiveerd, die verantwoordelijk is voor de beschreven verschijnselen.

Het zal duidelijk zijn dat veel nader onderzoek omtrent allerlei factoren noodzakelijk is, voordat het gedrag van het ijzertransferrine systeem in vivo op afdoende wijze via dergelijke fysisch-chemische grootheden gekarakteriseerd kan worden.

## SAMENVATTING

In dit proefschrift wordt een onderzoek beschreven zoals dit door ons verricht is aan het ijzertransferrine systeem en dat tot doel had de evenwichtsconstanten en de reactieconstanten van dit systeem in wel-omschreven proefomstandigheden te bepalen.

Hoofdstuk I geeft een uitvoerig overzicht van de literatuur omtrent het ijzertransferrine systeem, voor zover deze van betekenis is voor genoemd onderwerp. De oudere onderzoeken die leidden tot de opvatting dat transferrine het ijzertransporterend eiwit is en de gegevens hiervan, worden besproken. Daarna wordt aangegeven wat de moderne inzichten omtrent de zuivering en bouw van het eiwit zijn. Diep wordt ingegaan op de diverse, vaak tegenstrijdige, gegevens omtrent de binding van ijzer aan transferrine. Aandacht wordt geschonken aan het feit dat transferrine zowel met Fe (II) als met Fe (III) reageert, terwijl in het ijzertransferrine complex het element in een octaëdrische omringing is gevat en met de electronspinresonantie-techniek het best als driewaardig ijzer te bezien is.

De betekenis van bicarbonaat, de pH en de invloed van andere ionen, zoals deze met verschillende technieken, - o.a. optische spectrometrie en electronspinresonantie zijn bestudeerd -, worden besproken.

De onderzoeken omtrent de evenwichtsconstanten door Davis e.a.<sup>56)</sup> en Aasa e.a.<sup>43)</sup> en die van Ross e.a.<sup>42)</sup> over de reactieconstanten, worden uitvoerig weergegeven.

Hoofdstuk II is gewijd aan de materialen en methoden die gebruikt, respectievelijk gevolgd werden bij het onderzoek. Onder de beschrijving van de methoden valt ook de techniek waarmee de diverse berekeningen en simulatie-experimenten zijn uitgevoerd.

De eerste methode waarmee de evenwichtsconstanten zijn bepaald, berust op een dialyse-opzet. De dialyse-experimenten worden weergegeven in hoofdstuk III. In dit hoofdstuk wordt in extenso de ontwikkeling van de proefopzet vermeld. De basis van deze techniek wordt gevormd door de bewezen veronderstelling dat bij onze omstandigheden de ijzerconcentratie binnen en buiten het dialyse-zakje gelijk is, terwijl transferrine en de ijzertransferrine complexen het membraan niet passeren.

Aangetoond wordt, dat bij deze experimenten gewerkt moest worden met ijzer als ijzer (III). Teneinde het ijzer in deze vorm te houden, was het noodzakelijk reductantia te gebruiken. Wij kozen, teneinde twee geheel verschillende omstandigheden te verkrijgen, het toevoegen van ascorbinezuur of natriumsulfiet respectievelijk het doorleiden van waterstofgas.

Met deze dialyse-opzet werden de dissociatieconstanten berekend onder verschillende omstandigheden en uitgangstoestanden. De concentratie van ijzer in de buitenvloeistof en de transferrine- en de ijzerconcentraties in de binnenvloeistof werden hierbij bepaald. Uit deze gegevens werden op grond van de besproken basisveronderstellingen de dissociatieconstanten berekend. Daartoe werden twee wiskundige formuleringen in dit hoofdstuk afgeleid.

Door een aantal dialyse-experimenten uit te voeren met Fe-59 was het mogelijk aan te tonen dat wij hier te maken hebben met een dynamisch evenwicht. Verder was het mogelijk enkele conclusies te geven over de rol van het bicarbonaat-ion op grond van proeven waarbij extra bicarbonaat werd toegevoegd en over de rol van de temperatuur op grond van proeven bij verschillende temperaturen. Met de dialyse-experimenten waarbij ascorbinezuur aanwezig was, werden voor de dissociatieconstanten gevonden:

$$K_1 = 0,25 \times 10^6 \text{ mol/l met standaardafwijking van het gemiddelde} = 0,15 \times 10^6.$$

$$K_2 = 0,50 \times 10^5 \text{ mol/l met standaardafwijking van het gemiddelde} = 0,30 \times 10^5.$$

In hoofdstuk IV worden experimenten beschreven waarbij metingen van de extinctie bij 470 nm aan het ijzertransferrine complex in oplossing werden verricht. Deze extinctie-metingen geven de mogelijkheid de hoeveelheid ijzer, die aan transferrine is gebonden, vast te stellen. Dit gegeven, tezamen met de bepaling van de totale ijzer- en transferrine-concentratie, maakt soortgelijke berekening als in hoofdstuk III mogelijk. Voor

$K_1$  en  $K_2$  werd respectievelijk gevonden:

$$K_1 = 0,20 \times 10^6 \text{ mol/l met standaardafwijking van het gemiddelde} = 0,10 \times 10^6.$$

$$K_2 = 0,50 \times 10^5 \text{ mol/l met standaardafwijking van het gemiddelde} = 0,30 \times 10^5.$$

Hoofdstuk V is gewijd aan de beschrijving van de experimenten die uitgevoerd zijn om met behulp van het opnemen van electronspinresonantie-spectra inzicht te verkrijgen in de toestand van het ijzer in het ijzer-transferrine-complex. Het gebruik van Fe (II) in de proeven, genoemd in de voorgaande hoofdstukken, maakte het noodzakelijk na te gaan in hoeverre de reactie tussen Fe (II) respectievelijk Fe (III) en transferrine tot hetzelfde produkt leidde. De verkregen gegevens wijzen erop dat dit het geval is. Aangetoond wordt in dit hoofdstuk, dat aan transferrine een overmaat ijzer tot  $\pm 150\%$  moet worden toegevoegd, voordat sprake is van een verzadigings-toestand. Dit komt overeen met de in de vorige hoofdstukken vermelde K-waarden.

De beschrijving van de proeven over de reactie-kinetiek en de berekening van de reactieconstanten is het onderwerp van hoofdstuk VI.

Dit hoofdstuk is onderverdeeld in twee gedeelten, te weten de oriënterende experimenten waarbij het verloop van de reactie werd gevolgd door het meten van de extinctie-verandering bij 470 nm in de tijd met een Zeiss spectrofotometer en de proeven die zijn uitgevoerd met de "stopped-flow" techniek, waarbij ook metingen bij 470 nm werden verricht.

Uit de resultaten van de eerstgenoemde experimenten kwam tot uiting dat ijzer (II) sneller reageert met transferrine dan ijzer (III). Op beide ion-soorten heeft een extra toevoeging van bicarbonaat een versnellende invloed. Het berekenen van de reactieconstanten geschiedt met een simulatie-techniek, die berust op een numerieke methode, gebaseerd op de Runge-Kutta-rekenwijze en uitgevoerd met de computer van het Centraal Klinisch-Chemisch Laboratorium van het Academisch Ziekenhuis Dijkzigt.

Het bleek niet mogelijk een redelijke benadering van de reactieconstanten  $k_{-1}$  en  $k_{-2}$  te geven, voor  $k_1$  en  $k_2$  werd respectievelijk gevonden  $0,5 \times 10^3$  en  $0,2 \times 10^3$ ; en wanneer extra bicarbonaat was toegevoegd, werd dit:  $0,1 \times 10^4$  en  $0,2 \times 10^5$ , alles in mol/l/sec.

In het laatste hoofdstuk wordt uitvoerig ingegaan op het feit dat met de door ons gevonden K-waarden een relatief hoge concentratie vrij ijzer aanwezig is, een gegeven, dat niet overeenkomt met de literatuurgegevens. In hoeverre een en ander samenhangt met het feit, dat Fe (II) werd gekozen, wordt ook besproken en in het bijzonder wordt ingegaan op de mogelijke reactiemechanismen.

Het opvallende verschil in de invloed van extra bicarbonaat op  $k_1$  en  $k_2$  werd aangetoond. Vastgesteld wordt, dat een definitieve conclusie dient te wachten op proeven in bicarbonaat-vrij milieu.

## SUMMARY

The investigation described in this thesis was performed with the iron-transferrin system. The aim of this investigation was to determine the values of the dissociation constants and the rate constants for this well-defined system. An extensive survey of the literature of the iron-transferrin system as far as this is important for our studies has been given in chapter I. From the early investigations the conclusion is drawn that transferrin is the protein with a transport function for iron in blood. The modern views about the purification and the chemical composition of the protein are then given. The different and the conflicting data obtained for the binding of the iron to transferrin is thoroughly discussed. Attention has been paid to the fact that transferrin reacts as well with iron (II) as with iron (III). The iron in the iron-transferrin complex is surrounded in an octahedral way. Using the method of electron spin resonance the state of the metal in the complex might be considered being trivalent. The importance of bicarbonate, the pH and the influence of other ions, studied with different techniques like optical spectrometry and electron spin resonance spectrometry have been discussed. The investigation with regard to the dissociation constants and rate constants performed by Davis et al.<sup>56)</sup>, Aasa et al.<sup>43)</sup> and Ross et al.<sup>42)</sup> are reported in detail.

In chapter II the materials and the methods used in our experiments are described. This description includes the techniques used for the various calculations and simulation experiments.

The first method with which the dissociation constants have been estimated is based on dialyzing experiments. The development of our experimental approach we discussed in chapter III. The technique is based on the



assumption that in our experimental design the iron concentration is the same inside and outside the dialyzing tube and that transferrin and the iron-transferrin complexes are not able to cross the membrane. We were able to prove these assumptions. It was demonstrated that in these experiments iron should be in the iron (II) state. To keep the iron in this state it was necessary to use a reducing agent. In order to obtain different conditions we added ascorbic acid or sodium sulfite or we perfused the solution with hydrogen gas from a cylinder.

With this experimental approach we were able to measure the dissociation constants under different conditions. The iron concentration in the solution outside the dialyzing tube and the transferrin and iron concentrations inside the tube were determined. Using these data, under the assumptions mentioned earlier the dissociation constants were calculated with two mathematical expressions derived for this purpose.

The use of Fe-59 in the dialyzing experiments enabled us to show the dynamic state of the equilibrium. Furthermore some conclusions could be given on the role of the bicarbonate-ion and the temperature of the system. With these dialyzing-experiments we found for the dissociation constants the following values:

$K_1 = 0.25 \times 10^6$  with a standard deviation of the average:  $0.15 \times 10^6$ .

$K_2 = 0.50 \times 10^5$  with a standard deviation of the average:  $0.30 \times 10^5$ .

In chapter IV we described the determination of the extinction at 470 nm of the iron-transferrin complex. The measurements of this extinction gave us the possibility to calculate the amount of iron bound to transferrin. These data and the determinations of the total amount of iron and the transferrin concentrations were also used to calculate the values of the dissociation constants in the same way as described in chapter III. For  $K_1$  and  $K_2$  we found respectively:

$K_1 = 0.20 \times 10^6$  with a standard deviation of the average:  $0.10 \times 10^6$ .

$K_2 = 0.50 \times 10^5$  with a standard deviation of the average:  $0.30 \times 10^5$ .

The experiments we performed with an electron spin resonance spectrometer are extensively described in chapter V. With the results of these experiments we tried to gain insight into the valence of the iron in the metal-protein complex. As already mentioned in previous chapters we used iron (II) for the reaction. Thus it was necessary to control how far the reaction between iron (II) or iron (III) with transferrin led to the same product.

The results obtained showed that the same products had been formed in

both cases. In this chapter we demonstrated that an excess of iron up to 150% had to be added before transferrin was fully saturated. These data agreed with the K-values reported in the previous chapters.

The description of the experiments about the reaction kinetics and the calculation of the rate constants is the subject of chapter VI. This chapter has been divided in two sections. The first part deals with the experiments which were performed to obtain informative data.

The reaction between iron and transferrin was followed with a Zeiss spectrophotometer. In the second part we described the experiments with the "stopped-flow" apparatus. With both methods we measured the course of the extinction at 470 nm in relation with the time. The data from the first section showed that iron (II) reacted faster with transferrin than iron (III). The addition of bicarbonate to the reaction mixture accelerated the velocity of the reaction in both cases.

The calculation was performed with the computer configuration of the Central Clinical Chemical Laboratory of the Academic Hospital Dijkzigt, using a simulation technique based on the numerical method of Runge-Kutta.

It was not possible to give exact values of the velocity of the dissociation reactions. The values of the rate constants for the two association reactions were respectively:

$$k_1 = 0.5 \times 10^3 \text{ and } k_2 = 0.2 \times 10^3.$$

When we added an extra amount of bicarbonate we found for  $k_1 = 0.1 \times 10^4$  and for  $k_2 = 0.2 \times 10^5$ .

In the last chapter we discussed the fact that with our experimentally determined K-values a relatively high concentration of free iron must be present.

This fact is in contradiction with data from the literature. As to how far this is coherent with the fact we used iron (II) is discussed. Particularly, emphasis has been placed on the discussion of the possible mechanisms of the reaction iron + transferrin  $\rightarrow$  iron transferrin complexes are reported. Definite conclusions can not be drawn, until experiments have been performed in solutions completely free of bicarbonate.

# LITERATUUR REFERENTIES.

1. N. Lemmery, E. Geoffroy, H.A. Christian. Med. Libr. Hist. J. 1 (1903) 176.
2. C.A. McMunn. Phil. Trans. Roy. Soc. Londen 177 (1886) 267.
3. G. Fontès, L. Thivolle. Compt. Rend. Soc. Biol. 93 (1925) 687.
4. G. Barkan. Z. Physiol. Chemie 171 (1927) 194.
5. G. Barkan, O. Schales. Z. Physiol. Chemie 248 (1937) 96.
6. B. Valquist. Das Serum Eisen; Diss. Uppsala, Appelbergs Boktryck, 1941.
- 7a. L. Heilmeyer, H. Plötner. Klin. Wochenschr. 46 (1936) 1669.
- 7b. L. Heilmeyer. Deutsch. Arch. Klin. Med. 179 (1936) 216.
- 7c. L. Heilmeyer. Acta Haematol. 36 (1966) 40.
8. C.G. Holmberg, C.B. Laurell. Acta Physiol. Scand. 10 (1945) 307.
9. A.L. Schade, L. Caroline. Science 100 (1944) 14.
10. A.L. Schade, L. Caroline. Science 104 (1946) 340.
11. A.L. Schade, R.W. Reinhart, H. Levie. Arch. Biochem. 20 (1949) 170.
12. C.G. Holmberg, C.B. Laurell. Acta Chem. Scand. 1 (1947) 944.
13. G. Alderton, W.H. Ward, H.L. Fevold. Arch. Biochem. 11 (1946) 9.
14. M. Sørensen, S.P.L. Sørensen. S.R. Trav. Lab. Carlsberg 23 (1939) 55.
15. B. Blanc, H. Isliker. Helv. Physiol. Pharmacol. Acta 19 (1961) C13.
16. P.L. Masson, J.F. Heremans, E. Schonne. J. Exp. Med. 130 (1969) 643.
17. D.M. Surgenor, B.A. Koechlin, L.E. Strong. J. Clin. Invest. 28 (1949) 73.
18. E.J. Cohn, L.E. Strong, W.L. Hughes Jr., D.J. Mulford, J.N. Ashworth, M. Melin,  
H.L. Taylor. J. Amer. Chem. Soc. 68 (1946) 459.
- 19a. A.G. Bearn, W.C. Parker in: Iron Metabolism, ed. F. Gross, Springer-Verlag Berlin (1964)  
60.
- 19b. C.B. Laurell. Acta Physiol. Scand. 14 (1946) suppl. 46, 1.
- 19c. A.G. Bearn, W.C. Parker in: Glycoproteins, ed. A. Gottschalk, B.B.A. Library, deel 5,  
Elsevier Amsterdam (1966) 413.

20. E.J. Cohn, B.A. Koechlin. Abstracts 112th Meeting Am. Chem. Soc. New York (1947)  
p. 30C.
21. B.A. Koechlin. J. Amer. Chem. Soc. 74 (1952) 2649.
22. W.C. Parker, A.G. Bearn. J. Exp. Med. 115 (1962) 83.
23. J.K. Inman, F.C. Coryell, K.B. McCall, J.T. Sgouris, H.D. Anderson. Vox Sang. 6 (1961)  
34.
24. J.O. Jeppson. Biochim. Biophys. Acta 140 (1967) 468.
25. W.E. Roop, F.W. Putnam. J. Biol. Chem. 242 (1967) 2507.
26. H.E. Schultze, J.F. Heremans. Molecular Biology of Human Proteins, Elsevier Amsterdam  
(1966) 182.
27. C. Biserte, R. Vavez, J. Laturaze, A. Hayem-Lévi. Pathol. Biol. Semaine Hop. 9 (1961)  
1681.
28. J.L. Oncley, G. Scatchard, A. Brown. J. Phys. Coll. Chemie 51 (1947) 184.
29. K.G. Mann, W.W. Fish, A.C. Cox, C. Tanford. Biochemistry 9 (1970) 1348.
30. O. Smithies. Biochem. J. 61 (1955) 629.
31. A. Bezkorovainy, D. Grohlich, C. Gerbeck. Biochem. J. 110 (1968) 765.
- 32a. W.C. Parker, A.G. Bearn. Science 134 (1961) 106.
- 32b. W.C. Parker, A.G. Bearn. Nature 196 (1962) 477.
- 32c. W.C. Parker, A.G. Bearn. Science 137 (1962) 854.
33. J.O. Jeppson, J. Sjöquist in: Protides of the Biological Fluids, deel 14, ed. H. Peeters,  
Elsevier Amsterdam (1967) 87.
34. G.A. Jamieson. J. Biol. Chem. 240 (1965) 2914.
35. J.O. Jeppson. Acta Chem. Scand. 21 (1967) 1686.
36. F.C. Greene, R.E. Feeney. Biochemistry 7 (1968) 1366.
37. A. Ehrenberg, C.B. Laurell. Acta Chem. Scand. 9 (1955) 68.
38. J.S. Griffith. The theory of transition - Metal ions; The University Press, Cambridge (1961)  
274.
39. B. Malmström, T. Vänngård, R. Aasa, P. Saltman. Fed. Proc. 22 (1963) 595.
40. P. Aisen, A. Leibman, H.A. Reich. J. Biol. Chem. 241 (1966) 1666.
41. R.C. Warner, I. Weber. J. Amer. Chem. Soc. 75 (1953) 5094.
42. J. Ross, S. Kochwa, L.R. Wasseman. Biochim. Biophys. Acta 154 (1968) 70.
43. R. Aasa, B.G. Malmström, P. Saltman, T. Vänngård. Biochim. Biophys. Acta 75 (1963) 203.
44. P. Aisen, R. Aasa, B.G. Malmström, T. Vänngård. J. Biol. Chem. 242 (1967) 2484.
45. J.W. Young, D.J. Perkins. Eur. J. Biochem. 4 (1968) 385.
46. M. Pollycove in: Iron Metabolism, ed. F. Gross, Springer-Verlag Berlin (1964) 148.
47. D. Gillin. J. Clin. Invest. 25 (1956) 44.
48. J.H. Jandl, J.H. Katz. J. Clin. Invest. 42 (1963) 314.

49. C.B. Laurell. *Blood* 6 (1951) 183.
- 50a. W.F. Wiltink, H.J. Ybema, B. Leijnse, J. Gerbrandy. *Clin. Chim. Acta* 13 (1966) 701.
- 50b. W.F. Wiltink, H.J. Ybema, B. Leijnse, J. Gerbrandy. *Clin. Chim. Acta* 14 (1966) 320.
51. R. Yoshioha, T. Fujii, Y. Ito. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 24 (1966) 203.
52. R.V. Wenn, J. Williams. *Biochem. J.* 108 (1968) 69.
53. H.G. van Eijk, R.J. Vermaat, B. Leijnse. *FEBS Lett.* 3 (1968) 193.
54. R.C. Woodworth, A.T. Tan, L.R. Virkaitis. *Nature* 223 (1969) 833.
55. R.C. Woodworth in: *Protides of the Biological Fluids*, deel 14, ed. H. Peeters, Elsevier Amsterdam (1967) 37.
56. B. Davis, P. Saltman, S. Benson. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 8 (1962) 56.
57. G. Schwartzbach, J. Heller. *Helv. Chim. Acta* 34 (1951) 576.
58. J.T. Edsall, J. Wyman, *Biophysical Chemistry*, vol. 1, Academic Press New York (1958) hoofdstuk 10.
59. C.E. Rath, C.A. Finch. *J. Clin. Invest.* 28 (1949) 79.
60. A.G. Cornall, C.J. Bardawill, M.M. David. *J. Biol. Chem.* 177 (1949) 751.
61. G. Mancini, A.O. Carbonara, J.F. Heremans. *Immunochemistry* 2 (1965) 235.
- 62a. W.N.M. Ramsay. *Clin. Chim. Acta* 2 (1957) 221.
- 62b. W.N.M. Ramsay. *Biochem. J.* 49 (1951) 494.
63. P. Trinder. *J. Clin. Path.* 9 (1956) 170.
64. A. Zettner, L.S. Sylvia, L. Capacho Delgado. *Amer. J. Clin. Path.* 45 (1966) 533.
- 64a. B.G. Blijenberg. Persoonlijke mededeling; Methode zoals gebruikt wordt in het C.K.C.L. van het Academisch Ziekenhuis Dijkzigt.
65. L.B. Flexner, J. Vosburgh, D. Cowie. *Amer. J. Physiol.* 153 (1948) 503.
66. R.E. Feeney, St.K. Komatsu. *Structure and Bonding*, vol. 1, Springer-Verlag Berlin (1966) 149.
67. W. Feitknecht, P. Schindler. *J. Pure and Applied Chem.* 6 (1963) 168.
68. D.L. Leusing, I.M. Kolthoff. *J. Amer. Chem. Soc.* 54 (1948) 971.
69. M.E. Conrad, S.G. Schade. *Gastroenterology* 55 (1968) 35.
70. G.E. Cartwright, M.M. Wintrobe. *J. Clin. Invest.* 28 (1949) 86.
71. Q.H. Gibson. *Ann. Rev. Biochem.* 35 (1966) 435.
72. J. Williams, C.F. Phelps, J.M. Lowe. *Nature* 226 (1970) 858.
73. E. Stiefel. *Einführung in die numerische Mathematik, Methode von Runge-Kutta*, B.G. Teubner Verlagsgesellschaft Stuttgart (1965) 143.
74. H.G. v. Eijk, B. Leijnse. *Biochim. Biophys. Acta* 160 (1968) 126.
75. H. Svensson. *Acta Chem. Scand.* 15 (1961) 325.



## AANHANGSEL

Op de volgende pagina's staat het computer programma weergegeven dat gebruikt werd om de reactie constanten te berekenen. De technische bijzonderheden hiervan staan vermeld in de hoofdstukken II en VI.

Ook is in dit aanhangsel een weergave te vinden van een door de computer berekend verloop van de reactie tussen transferrine en ijzer.

De verticale as stelt hierbij de tijdas voor (als eenheid is hierbij een halve seconde gekozen) en de horizontale as de extinctie bij 470 nm; deze is vermenigvuldigd met 100 teneinde gehele getallen te verkrijgen.

In verband met de breedte van het gebruikte papier zijn enkele gegevens weggevallen die op het papier van de door ons gebruikte line-printer wel aanwezig waren en die in het programma beschreven zijn.

De experimenteel gevonden curven werden zoals reeds in voorgaande hoofdstukken uiteengezet werd, met dergelijke berekende curven vergeleken.

```

C      PROGRAMMA TER BEPALING VAN DE REACTIE-KINETIEK
      DIMENSIONAL(100)
      DATA BLANK,DOT,STAR,00/1H ,1H.,1H*,0.1E+03/
      F(X,Y)=AK11*(2.0*(A-X)-B+Y)-AK1*X*Y
      G(X,Y)=-AK1*X*Y+(AK11-BK2*X)*(2.0*(A-X)-B+Y)+BK22*(X-Y+B-A)
79     WRITE(4,80)
80     FORMAT(20H1 01-05-70 B.GLASER,/)
      KK=0
81     WRITE(4,82)
82     FORMAT(50H0 PROGRAMMA TER BEPALING VAN DE REACTIE CONSTANTEN,/)

83     WRITE(4,84)
84     FORMAT(23H0 VOER IN VOLGS E9.3  )
      WRITE(4,87)
87     FORMAT(36H0 RESP.(T0),(FE0),K1,K-1,K2,K-2,ST.G,/)
      P=0.0
      KK=KK+1
      READ(2,85)A,B,AK1,AK11,BK2,BK22,H
85     FORMAT(7(E9.3,2X))
      WRITE(4,85)A,B,AK1,AK11,BK2,BK22,H
      WRITE(4,90)
90     FORMAT(28H0 GEEF AANTAL BEWERKINGEN OP,/)
      READ(2,95)N
95     FORMAT(I3)
      WRITE(4,95)N
96     WRITE(4,10)
10     FORMAT(24H0 PLOTTEN? JA=50,NEEN=10,/)
      READ(2,15)M
15     FORMAT(I2)
      WRITE(4,25)M
25     FORMAT(H0,4X,I2)
      I=0
      X=A
      Y=B
      IF(M-25)9,23,23
9      WRITE(4,13)
13     FORMAT(52H0SER.N0.          VRY(1R)          VRY(FE)          AANT.ST          SG )
      WRITE(4,17)
17     FORMAT(H+,56X,43H(TFE)          (T2FE)          (TFE+2T2FE)  EXTINGT.,/)

      GO TO 53
23     CONTINUE
      I1=10
      I2=20
      I3=30
      I4=40
      I5=50
      I6=60
      I7=70
      I8=80
      I9=90
      I10=100
      WRITE(4,32)I1,I2,I3,I4,I5,I6,I7,I8,I9,I10
32     FORMAT(6H1 TYD ,10X,9(I2,8X),I3,5X,8HEXT.X100)
      DO 101 J=1,100
101    AL(J)=DOT
      WRITE(4,103)AL

```



```

103  FORMAT(1H ,5X,100A1)
      D0 105 J=1,100
105  AL(J)=BLANK
      AL(1)=D0T
53   Z1=H*F(X,Y)
      W1=H*G(X,Y)
      Z2=H*F(X+Z1/2.0,Y+W1/2.0)
      W2=H*G(X+Z1/2.0,Y+W1/2.0)
      Z3=H*F(X+Z2/2.0,Y+W2/2.0)
      W3=H*G(X+Z2/2.0,Y+W2/2.0)
      Z4=H*F(X+Z3,Y+W3)
      W4=H*G(X+Z3,Y+W3)
      ZZ=(Z1+2.0*Z2+2.0*Z3+Z4)/6.0
      WW=(W1+2.0*W2+2.0*W3+W4)/6.0
      P=P+H
      X=X+ZZ
      Y=Y+WW
      I=I+1
      C1=2.0*A-B-2.0*X+Y
      C2=X-Y+B-A
      C3=C1+2.0*C2
      E=2600.0*C3
      IF(M-25)S1,S4,S4
51   WRITE(4,61)KK,X,Y,I,P,C1,C2,C3,E
61   FORMAT(H0,I4,7X,E10.3,2X,E10.3,4X,I3,4X,E9.3,3X,4(E10.3,2X))
      G0 T0 56
54   CONTINUE
      D=E*Q0
      AF=ABS(D)
      IF(AF-100.0)18,19,19
18   J=AF
      G0T0 24
19   AG=AF/10.0
      IF(AG-100.0)20,21,21
20   J=AG
      G0T0 24
21   H=AG/10.0
      J=H
24   AL(J)=STAR
      WRITE(4,107)I,AL,D
107  FORMAT(1H ,I3,2X,100A1,7X,E8.2)
      AL(J)=BLANK
      AL(1)=D0T
56   CONTINUE
      IF(I-N)53,70,70
70   WRITE(4,72)
72   FORMAT(47H0 DIT WAREN DE WAARDEN,DIE VIA R-K ZYN BEREKEND,/)
      WRITE(4,77)
77   FORMAT(31HONOG EEN SERIE? JA=100 NEEN=000,/)
      READ(2,68)NN
68   FORMAT(I3)
      WRITE(4,69)NN
69   FORMAT(H0,I3)
      IF(NN-100)74,79,79
74   CONTINUE
      END
50   END 0F J2B
50

```

01-05-70 B.GLASER.

PROGRAMMA TER BEPALING VAN DE REACTIE CONSTANTEN

VOER IN VOLGS E9.3

RESP.(T0)+(FE0)\*K1-K-1,K2-K-2,ST.G

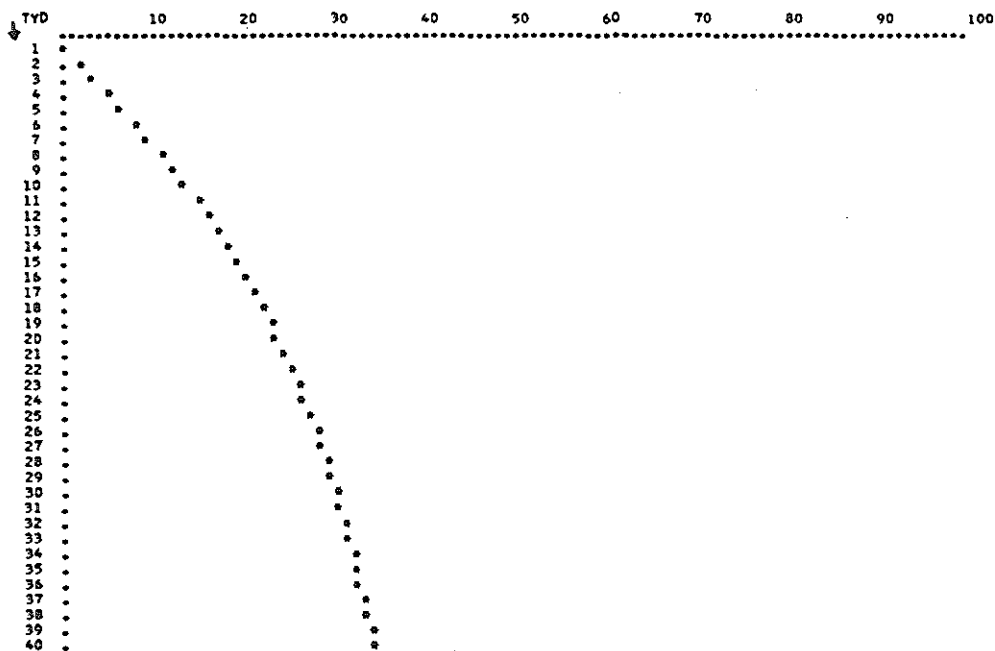
.125E-03 0.190E-03 0.500E 03 0.200E-02 0.200E 04 0.100E-01 0.500E 00

GEEF AANTAL BEWERKINGEN OP

40

PLOTTEN? JA=50,NEEN=10

50



DIT WAREN DE WAARDEN.DIE VIA R-K ZYN BEREKEND

## NASCHRIFT

Aan het einde van dit proefschrift wil ik de personen, die aan het tot standkomen van deze dissertatie hebben medegewerkt, mijn dank betuigen.

Hooggeleerde Leijnse, hooggeachte promotor, U dank ik voor de wijze waarop U het onderzoek geleid hebt en voor de tijd, die U, ondanks Uw zeer drukke werkzaamheden, mij geschonken hebt bij het schrijven van dit proefschrift. Het werken op Uw afdeling is voor mij een in elk opzicht leerzame periode geweest.

Hooggeleerde Berends, U wil ik danken voor Uw bereidwilligheid als coreferent voor dit proefschrift te fungeren.

Zeergeleerde van Eyk, U betuig ik mijn dank voor de nauwgezette wijze, waarop U als coreferent het proefschrift hebt beoordeeld, en voor de goede samenwerking op de afdeling gedurende de tijd, die ik hier op heb doorgebracht.

Het experimentele werk werd uitgevoerd in nauwe samenwerking met Mevr. R. J. Moraal-Vermaat en Mevr. M. D. de Haan-Klok. Beide dames dank ik bijzonder voor de manier waarop zij de dikwijls eindeloos lijkende series experimenten hebben uitgevoerd en voor hun kritische opmerkingen betreffende de hieruit verkregen resultaten.

Het grootste gedeelte van het typewerk van het manuscript werd op deskundige wijze verricht door Mevr. L. H. van Beek-Klosowski, waarvoor mijn dank.

De figuren, weergegeven in dit proefschrift, werden verzorgd door de Audiovisuele Dienst van de Medische Faculteit te Rotterdam, waarvoor ik de medewerkers van deze dienst bijzonder wil danken.

Dr. N. J. Verhoef ben ik zeer erkentelijk voor zijn hulp bij het totstandkomen van dit proefschrift in boekvorm.

Mijn ouders dank ik voor de gelegenheid die zij mij geboden hebben mijn studie te beginnen en te voltooien.

Tenslotte wil ik mijn schoonouders mijn dank betuigen voor de steun die zij mij hebben verleend, vooral gedurende de laatste jaren.



## CURRICULUM VITAE

Op verzoek van de Medische Faculteit te Rotterdam

In 1961 werd te Amersfoort door mij het Staatsexamen Gymnasium  $\beta$  afgelegd. In ditzelfde jaar volgde inschrijving aan de Technische Hogeschool te Delft in de afdeling Scheikundige Technologie.

Het propedeutisch-, kandidaats- en ingenieursexamen werden respectievelijk afgelegd in 1965, 1966 en 1968.

Het experimentele gedeelte van het laatstgenoemde examen werd verricht in het Laboratorium voor Biochemie en Biofysica van de Technische Hogeschool te Delft (Hoofd Prof. W. Berends).

Vanaf 1 november 1967 ben ik werkzaam als wetenschappelijk medewerker op de afdeling Chemische Pathologie van de Medische Faculteit te Rotterdam (Hoofd Prof. Dr. B. Leijnse). Op deze afdeling werd het in dit proefschrift beschreven onderzoek verricht.

